

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

**IMPORTANCIA DE LAS PEPTIDASAS COMO INDICADORES DE LA CALIDAD SEMINAL Y EMBRIONARIA HUMANA**

Memoria presentada por:

**Naiara González Espeja**

Dirigida por:

**Dr. Javier Gil Goikouria**

**Dr. Asier Valdivia Palacin**

Leioa, 2023



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera mostrar mis más sinceros agradecimientos a mis directores de Tesis Doctoral, el Dr. Javier Gil y Dr. Asier Valdivia por todo su trabajo, sus consejos y su paciencia.

A el Dr. Jon Irazusta que junto con Dr. Javier Gil, dieron inicio a este proyecto y cada uno de ellos ha estado presente en diferentes fases de éste, aportando cada uno sus diferentes formas de trabajar que tan bien se complementan.

Mil gracias al Dr. Nicolas Garrido y Dr. Marcos Meseguer, ellos me pusieron en contacto con este grupo de investigación y gracias a ello hoy culmino una etapa que empezó junto a ellos.

A todos mis compañeros de nuestro grupo de investigación que me han enseñado, ayudado, animado e insistido que podía hacer esto. Gracias Lorena, Itzaro, Laura, Ekaitz, Naia, Arantxa, Fatima, Maider, Bego, Gorka, Adolfo, Maider, Amaia y Luis. No solo habéis estado conmigo en la parte academica sino compartiendo grandes momentos de mi vida personal. Y por supuesto a Idoia mi gran amiga, con la que hemos compartido tanto dentro como fuera del la Universidad.

A Zaloa Larreategui directora del laboratorio de FIV en IVI Bilbao por enseñarme el maravilloso mundo de la embriología en el laboratorio y por el cual ha podido ver la luz este trabajo. A todos los compañeros que han pasado por este laboratrio y que me han aportado tantas cosas.

A mis padres Luis y Begoña, a ellos les hace esto más ilusión que a mi, supongo les hace sentirse orgullosos y pensar que algo han hecho bien en la difícil tarea de educar a una hija. A mi hermana Nekane tan iguales y tan diferentes.

A toda mi familia, empezando por mis abuleos, tios y primos. Pero haciendo especial hincapié en mis tias Carmen, Ana, Maite, Joaqui y Yoli, ellas siempre han estado y están ahí para todo.

Y por supuesto a mis hijos Pau y Libe que me han acompañado en parte de esta Tesis y que están deseando ver el fin, para estar más tiempo conmigo. Aunque espero que esto les sirva como aprendizaje del valor del esfuerzo y sacrificio.

Jon, nuestras Tesis nos unieron hace ya unos años y a día de hoy, nos une todo un proyecto de vida. Es la persona que siempre ha sabido que esto lo conseguiría y la que siempre, sin reproches me ha apoyado y nunca me ha juzgado. Gracias por tu apoyo, por tu ayuda, por tu comprensión, por tu aguante...por tantas cosas, pero principalmete, simplemente, gracias por estar a mi lado.

# **Índice**



<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Fisiología de la reproducción masculina</b>	<b>14</b>
1.1.1. Anatomía fisiológica del aparato reproductor masculino	14
1.1.2. Gametogénesis masculina	15
<b>1.2. Fecundación</b>	<b>18</b>
1.2.1. Transporte de los espermatozoides y de los ovocitos	18
1.2.2. Capacitación espermática	19
1.2.3. Reacción acrosómica	20
1.2.4. Fusión del espermatozoide con el ovocito	20
<b>1.3. Desarrollo embrionario</b>	<b>21</b>
1.3.1. Segmentación	21
1.3.2. Formación del blastocisto	21
<b>1.4. Implantación</b>	<b>22</b>
<b>1.5. Esterilidad e infertilidad</b>	<b>24</b>
1.5.1. Problemas de infertilidad	24
1.5.2. Estudio de la pareja infértil	24
1.5.3. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	25
1.5.4. Métodos de evaluación y selección embrionaria	26
<b>1.6. Biomarcadores asociados a la fertilidad</b>	<b>32</b>
<b>1.7. Las peptidasas</b>	<b>34</b>
1.7.1. Clasificación y nomenclatura de las peptidasas	34
1.7.2. Funciones de las peptidasas	36
1.7.3. Las peptidasas en la fisiología	39
1.7.4. Papel de las peptidasas en la fertilidad	39
1.7.5. Peptidasas analizadas en este trabajo	43
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>53</b>
<b>2.1. Objetivo General</b>	<b>55</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b>	<b>55</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>57</b>
<b>3.1. Reactivos y productos</b>	<b>59</b>
<b>3.2. Obtención del tejido biológico empleado</b>	<b>61</b>
<b>3.3. Fraccionamiento de la muestra</b>	<b>62</b>
<b>3.4. Análisis de la actividad peptidasica</b>	<b>64</b>
3.4.1. Preparación de las muestras seminales	64

## Índice

3.4.2. Determinación de la cantidad de proteína	64
3.4.3. Ensayos enzimáticos	64
<b>3.5. Análisis de los parámetros de calidad seminal</b>	<b>69</b>
3.5.1. Concentración espermática	69
3.5.2. Movilidad espermática	69
3.5.3. Morfología espermática	70
<b>3.6. Capacitación espermática</b>	<b>71</b>
<b>3.7. Punción folicular y recuperación de ovocitos</b>	<b>72</b>
<b>3.8. Inseminación de ovocitos</b>	<b>72</b>
3.8.1. Preparación de la dilución de inseminación	72
3.8.2. Preparación de las placas de inseminación	73
3.8.3. Procedimiento de inseminación de los ovocitos	73
<b>3.9. Preparación de los ovocitos para la microinyección intracitoplasmática</b>	<b>74</b>
3.9.1. Preparación de las placas de hialuronidasa	74
3.9.2. Decumulación de ovocitos	75
3.9.3. Clasificación de la maduración nuclear ovocitaria	75
<b>3.10. Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides</b>	<b>76</b>
<b>3.11. Valoración de la fecundación</b>	<b>77</b>
<b>3.12. Valoración de la calidad embrionaria</b>	<b>78</b>
3.12.1. Número de células	78
3.12.2. Fragmentación embrionaria	79
3.12.3. Simetría celular	82
3.12.4. Multinucleación	84
<b>3.13. Valoración morfológica del blastocisto</b>	<b>85</b>
3.13.1. Masa celular interna	86
3.13.2. Trofoctodermo	87
<b>3.14. Prueba de embarazo</b>	<b>87</b>
<b>3.15. Tasa de implantación</b>	<b>88</b>
<b>3.16. Seguimiento del embarazo</b>	<b>88</b>
<b>3.17. Tratamiento estadístico y ajuste de datos</b>	<b>88</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>91</b>
<b>4.1. Parámetros seminales, tasa de fecundación y parámetros de calidad embrionaria</b>	<b>93</b>
4.1.1. Parámetros de calidad seminal	93

4.1.2. Tasa de fecundación	94
4.1.3. Parámetros de calidad embrionaria	94
<b>4.2. Niveles de actividades peptidásicas en las diferentes fracciones seminales y su relación con indicadores de la calidad</b>	<b>96</b>
4.2.1. Distribución de la actividad enzimática en fracciones seminales	96
4.2.2. Relación entre la actividad enzimática y la edad en las diferentes fracciones seminales	98
4.2.3. Relación entre la actividad enzimática e indicadores de calidad seminal	99
<b>4.3. Actividades peptídicas seminales y tasa de fecundación</b>	<b>103</b>
<b>4.4. Actividades peptídicas seminales y calidad embrionaria</b>	<b>103</b>
4.4.1. Actividad enzimática y calidad embrionaria en Día 2 de desarrollo embrionario	104
4.4.2. Actividad enzimática y calidad embrionaria en Día 3 de desarrollo embrionario	111
4.4.3. Actividad enzimática y calidad embrionaria en Día 5 de desarrollo embrionario	118
4.4.4. Actividad enzimática y calidad embrionaria en Día 6 de desarrollo embrionario	120
<b>4.5. Actividades peptídicas seminales e implantación embrionaria</b>	<b>122</b>
4.5.1. Implantación	122
4.5.2. Porcentaje de implantación por transferencia	125
<b>4.6. Actividades peptídicas seminales y evolución en la gestación</b>	<b>129</b>
<b>4.7. Actividades peptídicas seminales y tasa de recién nacido vivo</b>	<b>142</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>147</b>
<b>5.1. Relación entre la actividad enzimática e indicadores de calidad seminal</b>	<b>153</b>
<b>5.2. Actividades peptidásicas seminales y tasa de fecundación</b>	<b>158</b>
<b>5.3. Actividades peptidásicas seminales y calidad embrionaria e implantación</b>	<b>161</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>167</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>171</b>



# **I. Introducción**



La infertilidad a día de hoy, es un problema médico y social con una gran importancia a nivel mundial que afecta a unos 70 millones de personas. La Organización Mundial de la Salud estima que el 9% de las parejas en todo el mundo sufren problemas de fertilidad y de este porcentaje el 50% son debidos a un factor masculino (Fainberg y cols., 2019; Wu y cols., 2022). La infertilidad no solo genera problemas sociales, físicos y psicológicos, como el estrés y la depresión, sino que también representa una importante carga económica (Mascarenhas y cols., 2012). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en los países occidentales, la prevalencia de la infertilidad se sitúa en torno al 17%, lo que supone que una de cada seis parejas en edad reproductiva presenta dificultades para tener descendencia.

La definición de esterilidad/infertilidad empleada por la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), la sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) y la Asociación Americana de Medicina de la Reproducción (ASRM) es la de la ausencia de consecución de embarazo tras 12 meses de relaciones sexuales frecuentes sin protección. Aún así, existen una serie de motivos, como la edad avanzada de la mujer o la presencia de distintas patologías masculinas o femeninas, en las que se aconseja el inicio del estudio de la esterilidad antes de que transcurra un año o el inicio directo de un tratamiento de reproducción asistida (Alamá y Remohí, 2011).

Hoy en día se sabe que la esterilidad puede ser de causa femenina, masculina o mixta, afectando a los dos miembros de la pareja. Se sabe que un 30% de los casos se deben a un factor masculino, otro 30% debido al factor femenino, el 25% son de etiología mixta y el 15% restante se debe a una esterilidad de origen desconocido, por lo que se asume que el 50% de los casos es de origen masculino y el otro 50% de origen femenino (Collins y cols., 2004; Dohle y cols., 2005). Con todos estos datos la esterilidad debe ser entendida como una enfermedad de pareja, donde ambos progenitores deben ser estudiados con la misma atención (Alamá y Remohí, 2011).

## **1.1. Fisiología de la reproducción masculina**

### **1.1.1. Anatomía fisiológica del aparato reproductor masculino**

El aparato genital masculino está constituido por una serie de estructuras integradas para que se dé lugar la función reproductora.

Los testículos son los encargados de la formación y almacenamiento de los espermatozoides y están localizados en el escroto. Es importante esta ubicación ya que les facilita tener una temperatura 2-3 °C por debajo de la temperatura corporal, que es la óptima para la producción de espermatozoides (Munkelwitz y Gilbert, 1998; Zoragniotti, 1980).

Cada testículo contiene cientos de túbulos seminíferos, densamente empaquetados y organizados en lóbulos separados, donde ocurre la espermatogénesis (Rhoades y Tanner, 1997). Estos túbulos se abren a la *rete testis* donde vierten su contenido y este es transportado por los conductos eferentes hasta el epidídimo (Guyton y Hall, 2021).

El epidídimo está situado detrás de los testículos y une a estos con los conductos deferentes. Se divide en tres partes (cabeza cuerpo y cola) (Rhoades y Tanner, 1997). Los espermatozoides tardan en recorrer este conducto varios días (Wen y Yang, 2000), ya que aquí se da su largo proceso de maduración (Cosentino y Cockett, 1986). Las secreciones durante este trayecto suponen un 5 % del semen, pero son imprescindibles en la adquisición de las propiedades necesarias para el proceso reproductivo de la fecundación (Jequier y Crich, 1986).

El contenido del epidídimo lo recoge el conducto deferente y lo transporta hasta el conducto eyaculador. Durante el trayecto existen unas glándulas que aportan secreciones al semen. Estas secreciones proceden de las vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales (Jequier y Crich, 1986), y son vertidas en la parte posterior de la uretra, empujando al esperma desde los epidídimos hacia la uretra.

Un 46-80% del líquido seminal lo aportan las vesículas seminales. Contiene entre otras sustancias, fructosa (sustrato principal para la glucólisis en el esperma), ácido ascórbico y prostaglandinas (Jequier y Crich, 1986).

La glándula que está situada debajo de la vejiga y está conectada con la uretra es la próstata (Rhoades y Tanner, 1997). Su secreción supone un 13-33% del líquido seminal. Esta secreción prostática contiene prostasomas que son unas vesículas membranosas que regulan algunos procesos importantes para la fecundación (Jequier y Crich, 1986). En los prostasomas se identifican compuestos lipídicos, iones, moléculas pequeñas y diversas proteínas (Utleig 2003). Las glándulas bulbouretrales dan el 2-5% al volumen del líquido seminal (Jequier y Crich, 1986).

## **1.1.2. Gametogénesis masculina**

### **1.1.2.1. La espermatogénesis**

Los espermatozoides se producen mediante un proceso de diferenciación celular llamado espermatogénesis, cuyo resultado es la formación de células haploides altamente especializadas a partir de células madre de la línea germinal (Clemont, 1972). Este proceso tiene una duración de entre 65-75 días.

El comienzo de la espermatogénesis se da en la pubertad, durante la subida de concentración de hormonas gonadotróficas (FSH y LH) y la secreción de testosterona llevada a cabo por las células de Leydig.

En la tercera semana de desarrollo embrionario aparecen las células germinales en las paredes del saco vitelino. Aquí sufren divisiones mitóticas y entre las semanas 4 y 5 llegan a las gónadas.

En la pubertad, estas células germinales se diferencian a espermatogonios de tipo A. Estos experimentan un número limitado de divisiones mitóticas para formar un clon celular, la última división celular produce espermatogonios de tipo B.

Estos espermatogonios de tipo B sufren la primera meiosis y al replicarse su DNA se convierten en espermatozoides primarios. Estos terminan la primera división meiotica y cada uno da lugar a dos espermatozoides secundarios. Posteriormente cada espermatozoides secundario sufre la segunda división meiotica para dar 2 espermatozoides.

## Introducción

Desde la formación de espermatogonios de tipo A hasta la formación de espermátidas la citocinesis es incompleta, por lo que las generaciones celulares sucesivas están unidas por puentes citoplasmáticos (Dudeck y Fix, 2004)

### **1.1.2.2. La espermiogénesis**

Los cambios que experimentan las espermátidas para llegar a ser espermatozoides es el proceso de espermiogénesis, donde se da una diferenciación celular sin división. Lo que ocurre es la formación del acrosoma, condensación del núcleo, eliminación de la mayor parte del citoplasma y formación del cuello, pieza media y cola.

Estos espermatozoides necesitan experimentar la capacitación y la reacción acrosómica para poder fecundar.

### **1.1.2.3. Estructura de los espermatozoides**

Los espermatozoides deben de llegar al ovocito para fecundarlo y para poder realizarlo el espermatozoide debe tener una morfología concreta. El espermatozoide se divide en tres partes.

a) *La cabeza*: donde encontramos tres estructuras muy importantes que son el acrosoma, el núcleo y el citoplasma (Browder y cols., 1991).

El acrosoma es una gran vesícula que se sitúa en la parte apical de la cabeza y donde se encuentran las enzimas hidrolíticas que mediante exocitosis (reacción acrosómica) se encargan de digerir la zona pelúcida del ovocito.

El núcleo se sitúa en la parte post-acrosómica. Aquí el DNA está muy condensado debido a que durante la espermatogénesis las histonas son reemplazadas por protaminas. En el núcleo también se encuentra RNA, con funciones aún desconocidas. Los espermatozoides maduros tienen un citoplasma muy reducido.

La pérdida del citoplasma de los espermatozoides se da cuando se liberan del epitelio de los túbulos seminíferos. Esta fracción de citoplasma que se pierde contiene RNA, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas

y peroxisomas. Debido a la alta condensación de la cromatina no se creará RNA *de novo* y como se ha perdido citoplasma y orgánulos, los RNA mensajeros no se traducen y no dan lugar a proteínas (Miller y Ostermeier, 2006). Esto significa que el espermatozoide no puede sintetizar nuevos compuestos por lo que debe llegar al ovocito con lo creado durante la espermatogénesis.

Durante el trayecto del epidídimo y del tracto uterino, se da un intercambio de proteínas y lípidos de membrana (Schuel y Burkman, 2005). Por ello, puede ocurrir que los espermatozoides varíen su actividad según el medio en el que se encuentren.

*b) Cuello:* es la pieza de conexión entre la cabeza y la cola, es un segmento estrecho que contiene un par de centriolos y proteínas asociadas. El centriolo distal origina el axonema, y el proximal contribuye al ensamblaje de la pieza de conexión a la envoltura nuclear (Kierszenbaum y Tres, 2012).

*b) Cola o flajelo:* la cola es una estructura compleja, especializada en proporcionar movimiento a la célula. La podemos dividir en varias partes, pieza intermedia, pieza principal y pieza final (Mortimer, 1997). Esta cola se mueve gracias al axonema, que está formado por microtúbulos, compuestos de tubulina. En total hay 9 pares en forma de anillo y en el centro otros dos. Unidos a estos microtúbulos, se encuentran los brazos de dineína, que son estructuras proteicas con actividad ATPasa que transforman la energía química en mecánica produciendo así movimiento (Marigomez y Cajaraville, 1999).

#### **1.1.2.4. Maduración espermática**

Una vez culminada de la espermatogénesis y liberados los espermatozoides a la luz de los túbulos seminíferos, estos deben sufrir grandes cambios fisiológicos y bioquímicos además de la transformación morfológica para que sean capaces de fecundar el ovocito. Estos cambios son los que se dan en la maduración espermática.

Los objetivos de esta maduración son la adquisición de movilidad y de los compuestos necesarios para el reconocimiento ovocitario (Gatti y cols.,

2004). A pesar de esto, la capacidad de fecundar se adquiere durante el paso por el tracto uterino, tras los procesos de capacitación y reacción acrosómica (Sadler, 2004).

### **1.1.2.5. Eyaculación espermática**

Los espermatozoides pueden permanecer durante un tiempo en los conductos deferentes. Durante la erección los espermatozoides se unen a las secreciones del líquido seminal. Con el semen en la uretra se crean señales que desencadenan la eyaculación formada por un componente celular que son los espermatozoides y otro líquido que es el líquido seminal. Para que los espermatozoides lleguen al interior del tracto reproductor femenino es necesario el líquido seminal que también es necesario para otras funciones. El líquido seminal contiene sustratos energéticos para crear ATP. También le da la propiedad de coagularse en un principio y que se mantenga lo más cerca del cuello uterino. Luego, tras 15-20 minutos, se licua y permite una mayor movilidad espermática. Gracias a los factores inhibidores que se encuentran en el líquido seminal, la actividad espermática se encuentra reducida impidiendo la capacitación y la reacción acrosómica (Guyton y Hall, 2021).

## **1.2. Fecundación**

La fecundación es el proceso mediante el cual se une el espermatozoide con el ovocito. Esta unión se da en la ampolla de la trompa uterina. Por lo tanto, para que se dé la fecundación el óvulo debe salir del ovario y llegar al oviducto, hasta donde debe llegar también el espermatozoide.

### **1.2.1. Transporte de los espermatozoides y de los ovocitos**

El semen del eyaculado debe llegar a la vagina, donde gracias a la protección del líquido seminal los espermatozoides pueden sobrevivir al pH ácido de la vagina. Los espermatozoides se separan del plasma seminal

para atravesar el cuello uterino. Solo el 1% de los espermatozoides que están en la vagina atraviesa el cuello uterino. Los espermatozoides llegan hasta las trompas, tras 2-7 horas, por el movimiento de su flagelo, aunque también se ven ayudados por movimientos de los líquidos y por la acción de los cilios uterinos. Al llegar al istmo de la trompa, los espermatozoides disminuyen su movilidad y finalizan su migración hasta la ovulación (Sadler, 2004).

Por otra parte, un poco antes de la ovulación las fimbrias de las trompas comienzan a cubrir la superficie del ovario y el oviducto inicia contracciones rítmicas. El ovocito viaja hacia la trompa por los movimientos de las fimbrias y por el movimiento de los cilios del revestimiento epitelial.

Desde la trompa, el ovocito sigue su camino gracias a que las células del cúmulo ooforo quitan sus prolongaciones citoplasmáticas de la zona pelúcida y se separan del ovocito, pudiendo llegar este hasta la ampolla de la trompa.

El fenómeno de la ovulación hace que los espermatozoides activen su movilidad posiblemente debido a sustancias quimioattractivas producidas por las células del cúmulo ooforo, lo que facilita que los espermatozoides lleguen al ovocito para poder fecundarlo (Sadler, 2004).

El proceso de capacitación y de reacción acrosómica que se deben dar en los espermatozoides para que puedan fecundar comienza con esta hiperactivación de la movilidad (Bedford, 1983).

### **1.2.2. Capacitación espermática**

Este proceso de puesta a punto del espermatozoide comienza cuando los espermatozoides se separan del plasma seminal y se ponen en contacto con los fluidos del aparato genital femenino. Este proceso dura unas 7 horas y es un proceso irreversible.

Ya en la trompa uterina, se dan interacciones epiteliales entre el espermatozoide y la mucosa de la trompa y también se eliminan factores que inhibían la actividad espermática (Mortimer, 1997).

## Introducción

Un ejemplo es la eliminación del colesterol de la membrana espermática, desestabilizando así la membrana de la cabeza del espermatozoide (Cross, 1996). El cambio en la permeabilidad de la membrana provoca una entrada de bicarbonato y calcio y salida de algunos iones, generando así una alteración en el metabolismo espermático (Flesch y Gadella, 2000).

### **1.2.3. Reacción acrosómica**

Durante el proceso de capacitación, se fusionan la membrana externa del acrosoma y la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (Flesh y Gadella, 2000). Esta fusión conlleva una pequeña liberación de las enzimas del acrosoma para que el espermatozoide pueda atravesar las células de la granulosa. Después los espermatozoides se unen a la zona pelúcida por mediación de la proteína ZP3 y la membrana exterior del acrosoma se disuelve, dando la liberación completa de las enzimas del acrosoma que digieren la zona pelúcida (Guyton y Hall, 2021).

Tanto el proceso de capacitación como el de reacción acrosómica, están dirigidos por sustancias que se encuentran en la trompa, por lo que estos procesos deben darse en un lugar y en un momento concreto, ya que, si no es así, los espermatozoides no tendrán la capacidad de fecundar (Harrison, 1996).

### **1.2.4. Fusión del espermatozoide con el ovocito**

Una vez el espermatozoide ha penetrado la zona pelúcida, entra en contacto con la membrana plasmática del ovocito (oolema) y es aquí donde ocurre la fusión entre las dos membranas celulares. El proceso de fecundación finaliza con la penetración del material genético del espermatozoide en el ovocito.

El cigoto formado se activa, probablemente por factores que lleva el espermatozoide, y comienza su división. Al alcanzar el estadio de mórula, el cigoto ya llega al útero donde se dará el proceso de implantación y continuará el desarrollo del embrión (Sadler, 2004).

## **1.3. Desarrollo embrionario**

### **1.3.1. Segmentación**

Cuando el cigoto ha llegado al período bicelular, experimenta una serie de divisiones mitóticas que producen un incremento del número de células. Estas células, que se tornan más pequeñas con cada división de segmentación, se denominan blastómeras y hasta la etapa de 8 células están agrupadas en forma poco compacta. Sin embargo, después de la tercera segmentación, el contacto de las blastómeras entre sí es máximo y forman una bola compacta de células que se mantienen juntas por medio de uniones estrechas. Este proceso, denominado compactación, separa a las células internas, que se comunican ampliamente por medio de uniones en hendidura, de las células externas. Tres días después de la fecundación, aproximadamente, las células del embrión compactando vuelven a dividirse para formar una mórula de 16 células. Las células centrales de la mórula constituyen la masa celular interna, y la capa circundante de células forma la masa celular externa. La masa celular interna origina los tejidos del embrión propiamente dicho y la masa celular externa forma el trofoblasto, que más tarde contribuirá a formar la placenta (Sadler, 2004).

### **1.3.2. Formación del blastocisto**

Aproximadamente en el momento en que la mórula entra en la cavidad del útero, comienza a introducirse líquido por la zona pelúcida hacia los espacios intercelulares de la masa celular interna. Poco a poco los espacios intercelulares confluyen y, por último, se forma una cavidad única, denominada blastocele o cavidad del blastocisto. En esta etapa, el embrión recibe el nombre de blastocisto. Las células de la masa celular interna, que en esta fase se denomina embrioblasto, están situadas en un polo, y las de la masa celular externa, o trofoblasto, se aplanan y forman la pared epitelial del blastocisto. En este momento la zona pelúcida ha desaparecido para permitir el comienzo de la implantación (Sadler, 2004).

## 1.4. Implantación

La implantación embrionaria se define como el proceso por el cual un embrión en fase de blastocisto se adhiere a la pared uterina y penetra primero en el epitelio y luego en el sistema circulatorio de la madre para formar la placenta.

La implantación del blastocisto humano es una paradoja biológica que no puede explicarse fácilmente (Denker, 1993; Ojosnegros, 2021). Es complicado entender cómo dos tipos de células epiteliales (células del blastocisto y células del endometrio) pueden conectar a través de sus membranas apicales (Bischof y cols., 1996). Finn (1986) propuso que "la respuesta del útero a la implantación del blastocisto recuerda a un proceso inflamatorio". Este proceso se produce generalmente en el tercio medio y superior de la pared posterior del útero y tiene lugar en un momento específico dentro del ciclo menstrual (Valbuena y cols., 1996). Este periodo comprende del día 6 al 10 después de la ovulación y debe coincidir con el desarrollo embrionario en estadio de blastocisto (Vigano y cols., 2003). La implantación transcurre en cuatro fases distintas, relacionadas y consecutivas, denominadas: aposición, adhesión, rotura de la barrera epitelial e invasión. Durante la aposición el blastocisto "busca" su lugar de implantación, orientándose de forma específica con su masa celular interna en el polo en el que el trofoctodermo se va a adherir al epitelio endometrial superficial. En la fase de adhesión, se produce el contacto directo con el epitelio endometrial y el trofoctodermo del blastocisto, con lo que el embrión queda "pegado" al útero. Ambas fases se producen entre el sexto y séptimo día después de la fecundación. La rotura de la barrera epitelial (epitelio y membrana basal) es fundamental para permitir la progresión del blastocisto hacia el estroma endometrial. Finalmente, durante la invasión, el trofoblasto embrionario penetra en el estroma e invade los vasos endometriales-miometriales, reemplazando en parte las células endoteliales (Simon y cols., 1999a).

Todo este proceso está regulado por multitud de factores que actúan de forma sistémica (endocrina) o local (paracrina y autocrina) tanto a nivel endometrial como embrionario (Simon y cols., 2000; Krüssel y cols., 2003).

El papel crucial de los esteroides ováricos en la preparación del endometrio en la fase de receptividad está fuera de toda duda; sin embargo, no son estas hormonas los efectores finales, sino que desencadenan una cadena de sucesos moleculares paracrinos intermedios (Simon y cols., 1999b). Dicha comunicación implica a tres compartimientos diferentes: a) la comunicación entre el epitelio y el estroma durante la adquisición de la receptividad y de la decidualización, b) las interacciones entre el embrión y el epitelio endometrial en las fases de aposición y adhesión; y c) el dialogo entre el estroma endometrial y el embrión durante la fase de invasión.

La clave del proceso de implantación es la cascada de mecanismos moleculares regulados por moduladores endocrinos, paracrinos y autocrinos de origen embrionario y materno. La selección mejorada tanto de los embriones viables como del fenotipo endometrial óptimo para la transferencia sigue siendo crucial para mejorar las posibilidades de implantación. Sin embargo, tanto la selección embrionaria morfológica clásica como las nuevas estrategias incorporadas a la práctica clínica, como el análisis genético embrionario, la morfocinética o la datación endometrial por ultrasonido, siguen siendo insuficientes para predecir el éxito de la implantación. Además, no se aplican técnicas para analizar las señales moleculares involucradas en la interacción embrión-utero. Por este motivo se estudian marcadores biológicos para predecir la competencia reproductiva embrionaria y uterina para mejorar los resultados del embarazo como pueden ser las "ómicas", que permiten la evaluación de perfiles moleculares endometriales y embrionarios completos durante la implantación. Las ómicas han mejorado nuestro conocimiento del proceso de implantación, identificando biomarcadores potenciales (Hernández-Vargas y cols., 2020).

Las investigaciones más actuales hablan de un papel de la biología reproductiva inflamatoria, epigenética, microARN, y microbioma vaginal y endometrial en la implantación (Sehring y cols 2022).

## **1.5. Esterilidad e infertilidad**

### **1.5.1. Problemas de infertilidad**

La definición de esterilidad es la incapacidad de una pareja para la concepción natural en el plazo de un año. En países desarrollados, los problemas de esterilidad afectan aproximadamente a un 10-15% de las parejas en edad reproductiva (Remohí y cols., 2012). Estas cifras aumentan año tras año y se constata el hecho de que cada vez son más las mujeres que optan por retrasar la maternidad, incrementando la frecuencia de problemas reproductivos (Minaretzis y cols., 1998; Balasch, 2008; Bonilla-Musoles, 2010). En España aproximadamente un 40,1% de las causas de esterilidad son de origen femenino, un 19,8% de procedencia masculina, un 21,0% de causa mixta, un 11,4% de origen desconocido, un 0,3% de parejas con enfermedades infecciosas transmisibles y un 7,4% de mujeres sin pareja masculina (Registro SEF, 2019). Sin olvidarnos de que, en cierta medida, la prevalencia de cada porcentaje varía con la edad.

Según la ESHRE en 2022, una de cada seis parejas en todo el mundo experimenta algún tipo de problema de infertilidad al menos una vez durante su vida reproductiva. Se estima que la prevalencia actual de infertilidad en mujeres de 20 a 44 años que dura al menos 12 meses afecta entre el 8 y el 12 % en todo el mundo. Por otro lado, se estima que en el mundo ya han nacido más de 10 millones de niños por técnicas de reproducción asistida. Este es un motivo por lo que las técnicas de reproducción asistida están en una constante investigación y avance para incrementar las posibilidades de las parejas para concebir un embarazo.

### **1.5.2. Estudio de la pareja estéril**

El estudio de la esterilidad debe ser simultáneo en ambos miembros de la pareja. Estos deberán acudir a consulta tras un año de haber mantenido relaciones frecuentes y no protegidas, y no se haya conseguido la gestación (Maruani y Schwartz, 1983). Dado que la edad de la mujer es determinante para su capacidad reproductiva (Quartim y cols., 2012), en

pacientes mayores de 35 años el estudio estará indicado si no se ha logrado concebir al cabo de seis meses. De igual modo, otras circunstancias individuales pueden hacer que se adelante la evaluación. Este sería el caso de mujeres con: patologías uterinas, tubáricas u ováricas, enfermedades de transmisión sexual, ciclos menstruales irregulares, etc. (González y cols., 2007; Bruna y cols., 2008).

La pareja se someterá a una serie de pruebas para poder determinar, en la medida de lo posible, el origen de la esterilidad y el tipo de tratamiento que se ajuste más a su situación. Así, se llevará a cabo tanto una completa anamnesis como exploraciones físicas, estudios hormonales y genéticos, seminogramas, etc. Una vez completado el estudio de fertilidad, se procederá a aplicar la técnica de reproducción asistida más adecuada en cada caso.

### **1.5.3. Fecundación *in vitro* (FIV)**

Las técnicas de reproducción asistida abarcan todas las prácticas que implican la manipulación *in vitro* de ovocitos, espermatozoides y/o embriones humanos con fines reproductivos (Zegers-Hochschild y cols., 2009). Debido a la existencia de un número cada vez mayor de parejas con problemas de fertilidad, el uso de técnicas de reproducción asistida está experimentando un notable aumento. Según el registro SEF (Sociedad Española de Fertilidad) se calcula que en el año 2019 los tratamientos de fertilidad generaron un total de 30.609 partos, donde han nacido 33.205 niños (Registro SEF, 2019).

La técnica de reproducción asistida más utilizada es la FIV. Consiste en una secuencia de pasos muy coordinados que comienza con la hiperestimulación ovárica de la paciente, seguida de la recuperación de los ovocitos bajo ecografía transvaginal, fecundación y cultivo embrionario en el laboratorio y transferencia cervical del embrión/es al útero materno. Actualmente, la fecundación *in vitro* puede realizarse mediante dos procedimientos diferentes: fecundación *in vitro* convencional, en la que óvulo y espermatozoide se unen de forma natural en el laboratorio, y la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides, en la que la

fecundación se realiza seleccionando e inyectando un único espermatozoide en cada óvulo.

Actualmente, los indicadores del éxito de un ciclo de FIV son la edad materna, la reserva folicular, la calidad seminal, la capacidad reproductiva previa, la respuesta a la estimulación ovárica, el número de embriones obtenidos y la calidad de los mismos (Arday y Calderón, 2008; López, 2008). No obstante, sería de gran utilidad poder determinar más factores pronósticos del éxito del tratamiento. Si la composición bioquímica del semen pudiera pronosticar la calidad embrionaria, podríamos considerar su utilización como un indicador de fertilidad.

### **1.5.4. Métodos de evaluación y selección embrionaria**

La fecundación *in vivo* en la especie humana se produce en la región ampular de la trompa de Falopio. Una vez fecundado, el ovocito es transportado a través de la trompa hasta el útero tardando en llegar entre 3 y 5 días. Durante estos días el embrión se nutre de sus propias células del complejo cúmulo-corona y de secreciones tubáricas procedentes del epitelio tubárico. Los procesos de fecundación *in vitro* han promovido el estudio de estos procesos embrionarios tempranos *in vitro*. Se ha visto que el desarrollo *in vitro* es muy similar a lo que sucede *in vivo*, aunque la velocidad de desarrollo del embrión humano *in vitro* parece que es más lenta que *in vivo*, debido principalmente a las propias condiciones *in vitro*. También se sabe que un gran número de embriones cultivados *in vitro* se bloquearán entre el estadio de 4-8 células. Este bloqueo ocurre generalmente coincidiendo con la puesta en funcionamiento del propio mecanismo de activación del genoma embrionario. Muchos de los centros que trabajan en FIV llevan a cabo la transferencia embrionaria en el día 3 de cultivo para evitar la degeneración de los embriones *in vitro*. Esta discordancia entre el estadio embrionario y la receptividad endometrial en el momento de la transferencia puede ser la responsable de las bajas tasas de niño en casa obtenida en estos procesos (Remohí y cols., 2002).

#### **1.5.4.1. Tasas de fecundación tras una fecundación *in vitro***

La fecundación de los ovocitos se confirma en el laboratorio de FIV con la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares entre 16-20 horas después de la inseminación. El proceso de fecundación comprende una serie de eventos empezando por la fusión del ovocito y el espermatozoide que lleva a la aparición de dos pronúcleos situados juntos entre 12-16 horas después de la inseminación, y que tienden a desaparecer a las 20-22 horas tras la inseminación. Aunque la aparición de los dos pronúcleos significa el final del proceso de fundación, la entrada en singamia y la división embrionaria pueden reflejar problemas ocurridos durante la incorporación del espermatozoide, el desarrollo y la alineación pronuclear, así como al inicio de la singamia. El ambiente citoplasmico del ovocito es el que regula la descondensación de la cromatina del espermatozoide y la formación de lo pronúcleos, y estos procesos son importantísimos la maduración meiotica y la activación. La morfología de los pronúcleos, en la especie humana, es uniforme, siendo imposible reconocer el origen parental de cada uno. El número, tamaño, posición y el contenido nucleolar en la especie humana se relaciona con el potencial de desarrollo de los cigotos (Remohí y cols., 2002).

#### **1.5.4.2. Evolución embrionaria**

La evaluación tradicional de los embriones humanos en el laboratorio de FIV, basada principalmente en criterios morfológicos, tiene limitaciones considerables. Se han llevado a cabo muchos estudios para encontrar otros parámetros indicadores de la viabilidad embrionaria que nos permita aumentar la tasa de embarazo y bajar la de los embarazos múltiples.

Así, para poder identificar los embriones más viables y con mayor potencial implantatorio entre la cohorte obtenida se usa comúnmente la evolución de la morfología embrionaria.

Los criterios estándar para la evaluación de la morfología embrionaria son: a) ritmo de división, analizado a través del número de células, b) presencia de fragmentos enucleados, c) tamaño y simetría celular, d) multinucleación,

## Introducción

e) apariencia del citoplasma, f) contacto entre las células, g) llegada al estadio de blastocisto (Remohí y cols., 2002).

*a) Ritmo de división:* El número de células refleja el ritmo de división de los embriones cultivados *in vitro*, y es un indicador importante de la capacidad de desarrollo e implantación. El número de células óptimo en día 2 es de 4 células y, en día 3 de 7-8 células; 6-9 o 10 células pueden ser aceptables si no hay asociadas otras anomalías.

Los embriones de 5 células o más de 10, sin más anomalías relevantes se consideran subóptimos. Los embriones que presentan en D2 6 células o más y en D3, 9 células o más poseen una alta posibilidad de presentar aneuploidías o blastómeras multinucleadas (Alikani y cols., 2000). Los embriones con 4 células o menos en D3 llegan a implantarse en raros casos, pero casi todos se bloquearán *in vitro*; se descartan como no viables.

Una velocidad de división normal es la que presenta un embrión que duplica su número de células en 24 horas de día 2 a día 3 (de 4 a 8, de 3 a 6, de 5 a 10, de 2 a 4), y constituye un pronóstico de viabilidad (Gerris y cols., 1999). Una velocidad mayor se relaciona con anomalías cromosómicas (Munné y cols., 1998), y una menor, con un posible bloqueo embrionario (Alikani y cols., 2000).

*b) Presencia de fragmentos enucleados:* Además del número de células, la fragmentación embrionaria es el parámetro más importante en la evaluación de la viabilidad de un embrión (Roseboom y cols., 1995). Aunque se han propuesto desde hace tiempo categorías simplificadoras, se debe cuantificar la fragmentación del embrión como el porcentaje del volumen que ocupa la fragmentación. Se desconoce si la aparición de la fragmentación es un efecto externo o es una propiedad inherente del desarrollo embrionario. El mecanismo debe ser la defensa del embrión para liberarse de componentes citoplasmáticos dañinos o para mantener cierta relación entre el citoplasma y el núcleo. Se han propuesto distintas hipótesis para explicar los efectos perniciosos de la presencia de fragmentos: el secuestro de proteínas reguladoras (Antczak y cols., 1999), la interferencia entre blastómeras (Edwards y Beard, 1997), o la inducción de la apoptosis (Jurisicova y cols., 1996). La mayoría de los fragmentos se forman en la

mitosis, durante las dos primeras divisiones celulares. Si la pérdida es grande y muy temprana, el desarrollo se puede ver gravemente perjudicado (Jurisicova y cols., 1995). La presencia de fragmentos no es indicativa, por sí sola, de una menor viabilidad, y los embriones con hasta un 35% de fragmentación se implantan en una proporción razonable tras retirarles con micromanipulación los fragmentos (Alikani y cols., 1999).

Si la distribución de los fragmentos es relevante, se distinguen cinco tipos. Los tipos I, II y III no se consideran perniciosos para un embrión hasta un grado de fragmentación del 10%. Si la proporción de fragmentación es de un 35%, se considera subóptimo. Si es mayor del 35% o del tipo IV, independientemente de la proporción, se considera anormal (Scott y cols., 2007).

*c) Tamaño y simetría celular:* En el embrión, las blastómeras evolucionan de una forma esférica irregular a una elipsoidal al llegar al estadio de 8 células. Se considera normal una distribución regular del volumen celular, de tal manera que todos las blastómeras tengan un tamaño similar en embriones con 2, 4 u 8 células. En el resto de embriones es normal una relativa asimetría. En este caso, se considera que tienen una simetría normal. Un embrión con un número impar de células y exactamente del mismo tamaño se considera que es asimétrico. Una ligera asimetría (diferencias de volumen de hasta el 20%) no se considera de mal pronóstico, pero los embriones con células claramente asimétricas se pueden considerar como subóptimos (Hardarson y cols., 2001). Las células muy alargadas y algo deformes pueden estar en división. Los embriones que presentan una blastómera de gran tamaño en relación al resto (presencia de célula dominante, que ocupa una tercera parte o más del volumen del embrión) se consideran anormales, puesto que se asocia a una alta tasa de poliploidía (Munné y Cohen, 1998).

*d) Multinucleación:* Los embriones humanos muestran tanto *in vitro* como *in vivo* blastómeras multinucleadas. Este fenómeno se puede deber a una división nuclear sin la correspondiente celular, a la fragmentación del núcleo o una migración incorrecta de los cromosomas durante la anafase. La presencia de blastómeras multinucleadas en D2 y D3 se correlaciona con

## Introducción

una menor tasa de implantación y desarrollo hasta el estadio de blastocisto (Van Royen y cols., 2003). Estos embriones suelen ser mosaicos o aneuploides. Cuando aparecen sólo en D3, no parece que afecte tanto a su capacidad implantacional (Sandalinas y cols., 2001), de tal manera que los embriones con blastómeros multinucleados en D2 se consideran anormales y los que tienen embriones multinucleados en D3 y no en D2 son subóptimos. A la hora de evaluar la multinucleación tanto en D2 como en D3, se distinguirá la ausencia de multinucleación de la falta de visibilidad de los núcleos (si está en interfase no se observará núcleo alguno). Los primeros son los de mejor pronóstico.

*e) Apariencia del citoplasma:* El aspecto del citoplasma puede variar entre claro y algo granulado. La aparición de vesículas en el tercer día de desarrollo se considera una señal de activación del genoma embrionario, al aumentar la transcripción y, por lo tanto, el retículo endoplásmico y los lisosomas. Es, por consiguiente, un indicio de buena salud embrionaria (Desai y cols., 2000), pero no es un indicador de gran relevancia para distinguir la capacidad implantacional de un embrión.

Por otra parte, la aparición de vacuolas y la contracción del citoplasma se correlacionan con la degeneración y lisis del embrión. Los embriones que presentan estas alteraciones en más de dos blastómeros se consideran anormales. Los embriones que presentan estas alteraciones en sólo una o dos blastómeros se pueden considerar subóptimos dependiendo del tamaño de la anomalía. Habitualmente, es preferible dejarlos en observación hasta el estadio de blastocisto.

*f) Contacto entre células:* A veces, las células presentan muy pocas zonas de contacto entre ellas. La formación de uniones de adherencia (*tight junctions*) comienza en el estadio de 6-8 células y las uniones comunicantes (tipo *gap*) no aparecen hasta el estadio de morula (Fleming y cols., 2000). Estas uniones son relevantes para la compactación y diferenciación temprana del embrión. Los embriones cuyas células tienen pocas o ninguna zona de contacto entre sí presentan un mal pronóstico de supervivencia tras la congelación.

Dependiendo de las condiciones de cultivo, la compactación puede comenzar a observarse en día 3. Se considera de buen pronóstico la compactación en un embrión de al menos 8 células si ocurre por igual con todas las blastómeras. Se considera de mal pronóstico una compactación localizada o regional, pues demuestra una asincronía entre los blastómeros. Estos embriones se consideran desorganizados. También se consideran desorganizados los embriones que, no siendo asimétricos, presentan células de forma no elipsoidal, aunque no se puede descartar que la blastómera esté en división.

*g) Llegada al estadio de blastocisto:* El desarrollo embrionario es un proceso que ocurre durante varios días. Después de la compactación celular, en la que las células pierden su identidad celular, empieza a formarse una cavidad denominada blastocele y se produce la diferenciación celular. Esta nueva disposición morfológica del embrión recibe el nombre de blastocisto.

Dentro del estadio de blastocisto, pueden diferenciarse cinco tipos: Blastocisto temprano: comienza a formarse la cavidad y empieza la diferenciación celular. Blastocisto cavitado: el blastocele ocupa más del 50% del volumen del embrión. Blastocisto expandido: se observa el blastocele rodeado por una monocapa celular o trofoectodermo, que formará la placenta y una masa celular interna, que dará lugar al embrión. Con la expansión del embrión se produce un aumento del volumen y una disminución del grosor de la zona pelúcida. Blastocisto eclosionando o hatching: el blastocisto comienza a salir a través de la zona pelúcida. En este tipo, se puede diferenciar entre blastocisto eclosionando (cuando empieza la eclosión) y blastocisto eclosionando en 8 (cuando la mitad del blastocisto está fuera de la zona pelúcida). Blastocisto eclosionado o hatched: el blastocisto está completamente fuera de la zona pelúcida. Se observa la zona pelúcida vacía, aunque, en algunas ocasiones, es posible observar dentro fragmentos, e incluso, células que no compactaron y quedaron como células independientes en el espacio perivitelino.

Además del estadio del blastocisto, también se clasificará el tipo de masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (Tf) según el número de células que se observan.

## **1.6. Biomarcadores asociados a la fertilidad**

La fertilidad masculina se define como la capacidad de un hombre para embarazar a una mujer sana y fértil en edad reproductiva. El diagnóstico de un hombre fértil o infértil es extremadamente difícil, dado que este estado puede variar en cortos periodos de tiempo e incluso con diferentes parejas. En este sentido, es interesante definir una muestra de esperma como capaz de lograr un embarazo o no, en lugar de definir un hombre fértil o infértil (Braundmeier y Miller, 2001).

La única herramienta aceptada para estimar el potencial para convertirse en padre de un hombre es el análisis básico del semen según la Organización Mundial de la Salud. Este análisis se basa en la evaluación de características macroscópicas y microscópicas de espermatozoides (volumen, concentración de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y la morfología).

Los hombres subfértiles también se pueden definir como aquellos que no pueden lograr una concepción natural, pero son capaces de concebir con la ayuda de las técnicas de reproducción asistida. Cuando el análisis del semen es normal pero el hombre es infértil, este es diagnosticado de infertilidad idiopática (Kumar y cols., 2006), y este hecho apunta claramente a la necesidad de buscar marcadores más precisos para predecir un embarazo exitoso, ya sea por medio de la concepción natural o de reproducción asistida. Sin embargo, este es un tema complicado, ya que los marcadores estudiados en uno de los gametos tienen que predecir los resultados obtenidos por la interacción de ambos gametos.

Excepto las investigaciones de aneuploidías cromosómicas (Rubio y cols., 2001; Bernardini y cols., 2005), y microdelecciones del cromosoma Y (Martínez y cols., 2000), que están vinculados a graves alteraciones en el recuento de espermatozoides, no hay más estudios moleculares que nos sirvan como herramienta diagnóstica para completar en el análisis básico del semen.

Los parámetros clínicos no siempre permiten evaluar el potencial fértil del varón, ya que las causas de infertilidad no siempre pueden ser observadas en un análisis seminal. Por ello, se han llevados a cabo diversos estudios

para identificar y comprender los mecanismos moleculares que intervienen en la fertilidad masculina. Debido a ello, se han descrito diferentes mecanismos morfológicos y moleculares de los espermatozoides considerados como esenciales para la obtención de descendencia. Esto ha resultado en el desarrollo de distintas metodologías como pueden ser la tecnología de columnas de anexinas donde se seleccionan espermatozoides con baja fragmentación de su ADN, que permiten una selección objetiva de los mejores espermatozoides para usar en las distintas técnicas de fecundación *in vitro*.

En la literatura encontramos estudios de otros fenómenos celulares relacionados con la infertilidad como son la apoptosis, la integridad del ADN de los espermatozoides (Evenson y Wixon, 2006), el estrés oxidativo (Agarwal y cols., 2006; Garrido y cols., 2004) y los mRNA que nos permiten caracterizar perfiles de fertilidad (García-Herrero y cols., 2011). Todas estas nuevas aportaciones están permitiendo un mayor conocimiento sobre las moléculas implicadas en los procesos biológicos que sufren los espermatozoides.

Hasta ahora poseemos de pocas pruebas que puedan prever la posibilidad de un hombre de lograr un embarazo, aunque ya disponemos de estudios que demuestran la implicación de factores moleculares en la fertilidad masculina (Meseguer y cols., 2004; Meseguer y cols., 2006; Agirregoitia y cols., 2006; Ravina y cols., 2007). También se han estudiado marcadores moleculares en el semen que se han relacionado con la calidad y desarrollo embrionario, así como con el éxito de embarazo (Muriel y cols., 2006).

Sin embargo, sigue siendo necesario un estudio más detallado de todos estos elementos y procesos, para así, por una parte, lograr entender su función, su regulación, y por otra parte, poder determinar biomarcadores de infertilidad masculina.

La descripción de biomarcadores que ayuden a predecir o valorar la infertilidad masculina, supondría una gran mejora para su tratamiento. Estos biomarcadores podrían ser usados como pruebas complementarias al espermiograma, mejorando su poder diagnóstico.

Las peptidasas tienen una actividad fácilmente cuantificable y hay diversos estudios que analizan el posible papel de estas enzimas en la fisiología seminal (Subirán y cols., 2011). Por ello, las peptidasas se postulan como posibles biomarcadores de fertilidad masculina.

### **1.7. Las peptidasas**

Las peptidasas constituyen un grupo muy amplio y heterogéneo de enzimas. Se localizan en multitud de tejidos y humores del organismo, estado implicadas en la regulación de una gran cantidad de péptidos bioactivos, fundamentales en la comunicación intercelular del organismo (Fujiwara y cols., 1999). Actualmente, el amplio conocimiento de sus funciones ha hecho que se utilicen como marcadores de enfermedades y dianas terapéuticas. Durante los últimos años se descrito el rol que los sistemas de comunicación peptídica pueden tener en distintos procesos fisiológicos y patológicas relacionadas directamente con la fertilidad.

#### **1.7.1. Clasificación y nomenclatura de las peptidasas**

Las peptidasas son uno de los mayores grupos de proteínas funcionales. De hecho, el 2% de los genes que se transcriben son peptidasas. Constituyen un grupo muy heterogéneo de proteínas, que pueden encontrarse tanto unidas a membrana como en las fracciones solubles y que pueden presentar tamaños entre 25 y 300 kDa (Taylor, 1993).

En cuanto a la terminología, hay que tener en cuenta que en ocasiones se han empleado nombres diferentes para referirse a la misma enzima. Históricamente, los términos proteasa, proteinasa y peptidasa han tenido significados ligeramente diferentes. En la actualidad, el NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) recomienda emplear el término "peptidasa" para referirse a todas aquellas enzimas que rompen enlaces peptídicos. Los miembros de este grupo de proteínas se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas, en función de la situación del enlace que hidrolizan.

Así, las exopeptidasas rompen el enlace peptídico del último, o de los últimos 2 ó 3 aminoácidos de la cadena. Si su actuación tiene lugar en el extremo amino terminal se denominan *aminopeptidasas*, *dipeptidil-peptidasas* o *tripeptidil-peptidasas*, respectivamente. Si la hidrólisis sucede en el extremo carboxilo terminal, las enzimas serían *carboxipeptidasas*, o *peptidil-dipeptidasas*. Finalmente, las endopeptidasas catalizan la ruptura de enlaces peptídicos dentro de la cadena, y se clasifican en base a su mecanismo catalítico. Es decir, según la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis

Una posible clasificación de estas enzimas proteolíticas es la propuesta por Marks y cols., (1974, 1968a, 1968b), basada en la afinidad por diferentes sustratos cromogénicos. Según esta clasificación, las aminopeptidasas se agruparían en ácidas, básicas y neutras, dependiendo de que actuaran sobre sustratos ácidos, básicos o neutros, respectivamente. Por otro lado, también se ha nombrado a las peptidasas dependiendo del péptido sobre el que actúan.

En los años 90, se establecieron las bases de un sistema de clasificación según las secuencias y estructuras de las peptidasas. De esta clasificación surgió la base de datos *MEROPS*, que desde 1996 constituye en Internet una fuente referencial con datos de todas las peptidasas. Esta base de datos establece una clasificación jerárquica construida sobre los conceptos de *Tipo Catalítico*, *Clan*, *Familia* y *Peptidasa* (Barret y cols., 2004).

En un primer paso, las peptidasas se agrupan según el *Tipo Catalítico*, es decir la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis anteriormente mencionados, de los cuales tomarían la letra mayúscula inicial (A, C, M, S, T, U) de la clasificación. A continuación, las peptidasas se agrupan en clanes o familias, atendiendo a grupos de peptidasas homólogas.

Aunque existen diversas clasificaciones, las aportadas por la *Enzyme Commission* (EC), son las aceptadas actualmente. En esta clasificación, las peptidasas se encontrarían dentro del grupo E.C. 3.4, que hace referencia a las hidrolasas que actúan sobre enlaces peptídicos. La subclasificación

posterior estaría de acuerdo con la nomenclatura anteriormente mencionada, propuesta por Rawlings y Barrett en 1995 y 1999.

### **1.7.2. Funciones de las peptidasas**

#### **1.7.2.1 Las peptidasas como enzimas interconvertidoras de péptidos bioactivos**

La comunicación entre células es una condición indispensable para el funcionamiento coordinado de cualquier organismo. Esta comunicación se realiza principalmente mediante tres sistemas: el sistema hormonal, el sistema nervioso y los mediadores celulares. Los péptidos bioactivos son moléculas mensajeras empleadas por estos tres sistemas. Este tipo de moléculas se caracterizan por su ubicuidad, habiendo sido descritas en tejidos de todos los reinos de seres vivos, y por sus secuencias cortas de aminoácidos que pueden encontrarse libres o encriptadas en proteínas. Estos últimos requerirían la hidrólisis enzimática para su liberación (Sumitomo y cols., 2005; Ansorge y Reinhold, 2006; Daffre y cols., 2008). La acción conjunta de estos péptidos bioactivos con las enzimas y receptores involucrados forman los diferentes sistemas peptídicos, de vital importancia en la comunicación celular (Turner, 1986; 1987).

El control peptídico es un fenómeno altamente complejo, y a la vez flexible y aplicable al control de muy diversas funciones fisiológicas y en tipos celulares muy distintos. Así, los péptidos bioactivos están regulados por "convertasas" específicas que los hidrolizan (Hallberg y cols., 2005).

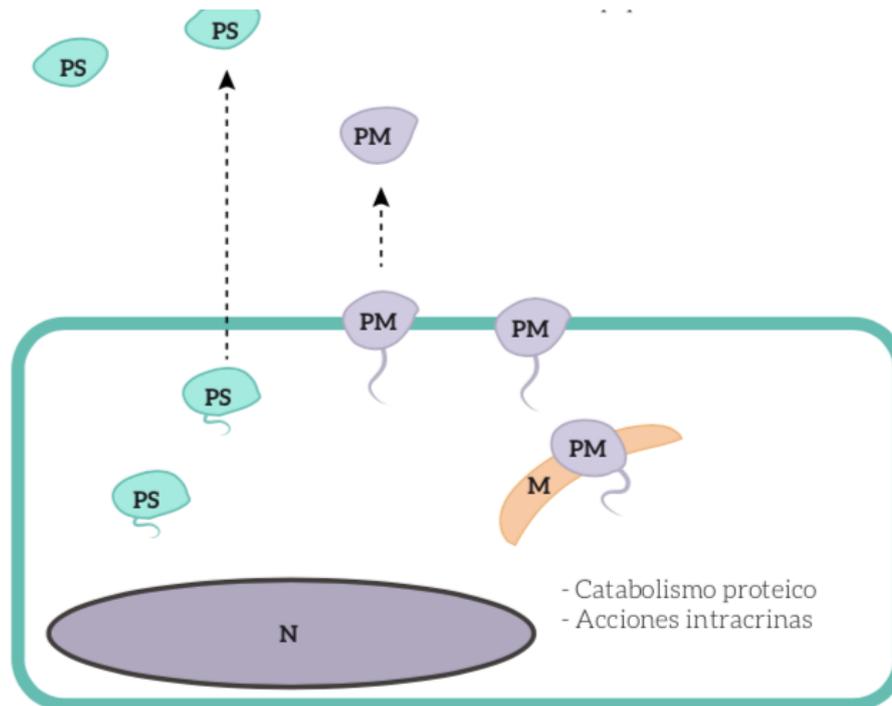
La función biológica más conocida de las peptidasas es la conversión de péptidos bioactivos. Gracias a su actividad hidrolítica, las peptidasas pueden modular las funciones de los mensajeros peptídicos, produciendo tanto formas activas, como inactivas (Antczak y cols., 2001). En su concepto clásico, las responsables de la conversión de péptidos bioactivos son las peptidasas de superficie celular o ectopeptidasas (Turner, 1986; 1987). Éstas, tienen el centro catalítico dirigido hacia el exterior de la célula, regulando así las funciones de estos mensajeros peptídicos (Turner, 1986; 1987; Taylor, 1993).

### **1.7.2.2. Acciones intracrininas de las peptidasas**

Las enzimas proteolíticas no sólo se han localizado en la superficie celular, sino que también se encuentran en forma soluble en el citosol, en el espacio extracelular, en la sangre y en otros fluidos corporales (Mantle, 1992; O'Cuinn, 1998; Gil y cols., 2001; Irazusta y cols., 2004; Valdivia y cols., 2004; Larrinaga y cols., 2005). Actualmente, existen varias hipótesis para explicar la función de estas diferentes localizaciones (Figura 1).

Por un lado, se ha descrito que tanto las formas unidas a la membrana como las formas solubles intracelulares pueden ser secretadas al exterior, donde participarían en la conversión de péptidos (Balogh y cols., 1998; Shrimpton y cols., 2002). Por otro lado, hasta hace poco se pensaba que la función de las peptidasas en el interior de las células se limitaba a la última etapa del catabolismo proteico (Mantle, 1992; O'Cuinn, 1998). Así, y dado que la acción de los péptidos bioactivos ocurre en la superficie celular, las peptidasas citosólicas no tomarían parte en su regulación metabólica, salvo que se secretaran al exterior. Sin embargo, en la última década, se ha descrito que además de la función endocrina, paracrina y autocrina, estos mensajeros peptídicos podrían tener funciones dentro de la propia célula.

Según algunos autores, muchos péptidos podrían actuar en el interior de la misma célula donde son sintetizados. Estos péptidos, mediante su unión a receptores intracelulares, regularían por acción intracrina funciones como el crecimiento celular (Re, 2002, 2003; Re y Cook, 2006).



**Figura 1.** Representación grafica de las diferentes localizaciones de las peptidasas y sus funciones en estos lugares.

*PM: peptidasa anclada a la membrana; PS: peptidasa soluble, tanto citosólica como secretada al espacio extracelular; N: núcleo; M: membrana citoplasmática (Blanco, 2010)*

### 1.7.2.3 Otras acciones de las peptidasas

Más allá de su acción sobre péptidos bioactivos, y gracias a su actividad catalítica, la acción de las peptidasas también forma parte de los procesos que conllevan a la degradación de la matriz extracelular. Así, se ha comprobado que tienen importancia en el desarrollo de nuevos tejidos, en la inflamación y, en procesos neoplásicos (Carl-McGrath y cols., 2006; Pérez y cols., 2009; Blanco y cols., 2010).

Algunas peptidasas pueden ejercer su función como moléculas de adhesión, proceso vital en el reconocimiento celular y necesario en fenómenos como la migración celular (Riemann y cols., 1999; Antczak y cols., 2001; Carl-McGrath y cols., 2006; Pro y Dang, 2004).

### **1.7.3. Las peptidasas en la fisiología**

Las peptidasas cumplen una tarea fundamental en la comunicación intercelular, condicionando diferentes funciones fisiológicas e influyendo en el desarrollo de diferentes procesos patológicos. Es conocida su participación en funciones como la memoria, el comportamiento y la nocicepción (Hui, 2007). En relación al sistema cardiovascular y en la función renal las vías metabólicas del sistema renina-angiotensina están reguladas por peptidasas (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008; Carrera y cols., 2009). En este sentido existen numerosos estudios que relacionan la actividad y la expresión de distintas peptidasas con patologías de estos sistemas (Hui, 2007; Pérez 2011). Además, algunas peptidasas son utilizadas como marcadores tumorales (Murakami y cols., 2005; Liu y cols., 2007; Havre y cols., 2008; Larrinaga y cols., 2010, 2011a, 2011b, 2012).

La utilización de inhibidores de estas enzimas es de uso común es en distintas terapias. Por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) se emplean habitualmente en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Wilcox y cols., 1988). Inhibidores selectivos de la enzima dipeptidil-peptidasa IV (DPP IV) se emplean en el tratamiento de la diabetes tipo II (Drucker y Nauck, 2006). También existen estudios bastante avanzados sobre el empleo de otros inhibidores de peptidasas, como los de la proilil-endopeptidasa (PEP) para el tratamiento de la demencia senil o los de la endopeptidasa neutra (NEP) y la aminopeptidasa neutra (APN) en el tratamiento del dolor, entre otros (García-Hornsman y cols., 2007; Noble y Roques, 2007).

Algunas de estas enzimas mencionadas en el párrafo anterior han sido objeto de estudio en el trabajo que se presenta en esta Memoria. En páginas posteriores se llevará a cabo una descripción más amplia y detallada de algunas de sus funciones y características.

### **1.7.4. Papel de las peptidasas en la fertilidad**

El ciclo reproductivo es un proceso fisiológico en los que se producen cambios importantes de los niveles hormonales. Por ello, no es de extrañar

## Introducción

que se produzcan alteraciones en las actividades de las enzimas proteolíticas a lo largo de él.

Los primeros estudios que relacionan las peptidasas con las hormonas sexuales aparecen a mediados del siglo XX. Vanhaper (1969) describe un aumento de actividad hipofisaria de leucina aminopeptidasa (Leu-AP) por acción de los estrógenos. También se observaron variaciones en actividades aminopeptidásicas hipotalámicas tras tratamientos con hormonas sexuales en ratas (Bickel y cols., 1972; Kuhl y cols., 1978). Al mismo tiempo, se observó, que tras administración gonadotropinas, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) era inactivada por la cistina aminopeptidasa (Cys-AP) y por un enzima parecido a la oxitocinasa (Kuhl y Taubert, 1975).

A finales de la década de los 80, nuestro grupo de investigación realizó un estudio sobre la variación de las actividades aminopeptidásicas tras la resección de testículos y ovarios. Pudimos observar un incremento mayor de actividad enzimática en ratas machos, que coincidía con una mayor elevación de los niveles de LH plasmáticos en los primeros días tras la castración (De Gandarias y cols., 1989). A partir de los trabajos mencionados anteriormente, se realizaron numerosos estudios de seguimiento de la actividad proteolítica durante el ciclo sexual, detectándose cambios cíclicos en estas actividades enzimáticas asociados a los cambios cíclicos de las gonadotropinas (De Gandarias y cols., 1990, 1993, 1994, 1996, 1999a, 1999b).

### **1.7.4.1. Sistemas de comunicación celular y fertilidad**

Los péptidos opioides y sus peptidasas, además de actuar sobre el eje hipotálamo-hipófisis, modulando la secreción de GnRH, FSH y LH (Fabbri y cols., 1989; Dobson y Smith, 2000; Parvizi, 2000), tienen también una acción directa sobre el aparato reproductor masculino y femenino (Dell'Aquila y cols., 2002; Kaminski y cols., 2003).

El sistema opioide endógeno, es uno de los sistemas de comunicación peptídica mas conocidos. Se encuentra presente en órganos y tejidos del tracto genital masculino y femenino, interviniendo en la función

reproductora. Otro importante sistema de comunicación intercelular es el sistema renina-angiotensina, presente en el ovario de múltiples especies (entre ellas la humana) (Nemeth y cols., 1994), de hecho, se ha propuesto su intervención en procesos tan importantes como la esteroidogénesis, la ovulación, el síndrome de ovario poliquístico y el síndrome de hiperestimulación ovárica (Harata y cols., 2006).

Respecto a la fertilidad masculina se han descrito tres tipos de receptores opioide en la membrana de espermatozoides humanos (Agirregoitia y cols., 2006; Albrizio y cols., 2006). Este hallazgo sugiere una acción regulatoria del sistema opioide sobre los espermatozoides, y por lo tanto, sobre la fertilidad masculina. Péptidos opioides como las encefalinas y las endorfinas están presentes, en elevadas concentraciones, en el fluido seminal (Sharp y Pekary, 1981). Además, son varios los estudios que relacionan al sistema opioide con la movilidad espermática, obteniendo resultados contradictorios. Elevadas concentraciones de encefalinas y  $\beta$ -endorfinas afectaban negativamente a la movilidad espermática (Sastry y cols., 1982). Se describió que los adictos a los opiáceos tenían peores valores de movilidad esperática (Ragni y cols., 1988). Por el contrario, existen estudios que describen bajos niveles de met-enkefalina en el semen de pacientes astenozoospermicos (Fujisawa y cols., 1996). Estudios posteriores han sugerido que para que los espermatozoides mantengan la movilidad es necesario un adecuado nivel de encefalinas e, incluso, que el efecto de estos péptidos depende de su concentración en el medio. Por lo que las peptidasas degradadoras de encefalinas, presentes en el líquido seminal, tendrían un papel clave en la movilidad espermática (Subirán y cols., 2011).

Otros procesos fundamentales en la fertilidad son la gametogénesis y el desarrollo folicular de los ovocitos, procesos que están regulados neto hormonalmente como a través de otras señales químicas producidas por el propio folículo ovocitario (Karlsson y cols., 1997; Eppig, 2001; Gilchrist y cols., 2004). Cada vez hay mayor evidencia científica que indica que las sustancias presentes en el entorno reproductivo influyen en procesos clave como la fecundación, la implantación y el desarrollo embrionario (Pardanaud y Dieterlenlievre, 1993; Hannoun y cols., 2010; Bianchi y cols., 2013).

## Introducción

En resumen, durante el ciclo sexual las células ováricas y endometriales sufren cambios en el crecimiento, diferenciación y regresión celular, por lo que el órgano reproductor femenino representa un buen modelo para el estudio de la regulación peptidérgica (Fujiwara y cols., 1999).

El sistema renina-angiotensina es un sistema peptídico con características endocrinas, principalmente conocido por su importancia en el mantenimiento de la presión arterial y la homeostasis de electrolitos y fluidos, a través de mecanismos renales y no renales (Paul y cols., 2006). Sin embargo, además de esta función sistémica, también se ha demostrado su existencia en distintos órganos y tejidos, ejerciendo diversas funciones específicas, así como en el interior de distintas células (Herr y cols., 2013). Todo esto supone que el sistema renina-angiotensina no solo actúa a nivel sistémico sino también, a nivel local e intracelular, mediante mecanismos paracrinos y autocrinos (Atlas, 2007; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

El sistema renina-angiotensina fue descrito tras observar que varios componentes de dicho sistema estaban presentes en los distintos órganos y tejidos reproductivos, entre los que se encuentran los testículos, el epidídimo, los conductos deferentes, la próstata, el líquido seminal y los espermatozoides (Leung y Sernia, 2003). Además, existen múltiples datos que indican que el sistema renina-angiotensina participa en la regulación de la fertilidad masculina interviniendo a múltiples niveles (Leung y Sernia, 2003; Paul y cols., 2006). De esta forma se ha visto que este sistema local puede ser regulado por las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, y que a su vez, el sistema renina-angiotensina local puede modular tanto la función testicular, como la función espermática (Okuyama y cols., 1988; Vinson y cols., 1997; Paul y cols., 2006).

Los espermatozoides para llevar a cabo correctamente su función, deben pasar por una serie de procesos como son la adquisición de la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica, y el reconocimiento, unión y fecundación del ovocito (Yoshida y cols., 2008; Sakkas y cols., 2015). Estos procesos están regulados por la actuación conjunta de diversos mecanismos moleculares, entre los cuales se encuentra el sistema renina-angiotensina (Yoshida y cols., 2008; Vinson y cols., 1997; Speth y cols., 1999). Así, tanto la presencia y distribución de los componentes del sistema renina-

angiotensina en los espermatozoides, como la actividad de las angiotensinas asociadas, sugieren que este sistema estaría regulando la función reproductora, actuando directamente sobre la capacidad fértil de los espermatozoides (Leung y Sernia, 2003).

### **1.7.5. Peptidasas analizadas en este trabajo**

En apartados anteriores de esta introducción, se han mencionado algunas enzimas con actividad peptidásica, así como su vinculación con ciertos procesos patológicos. La necesidad de simplificar y sistematizar los procesos en las terapias de reproducción asistida, permitiría un refinamiento de las técnicas, mejorando los resultados de las mismas, a la vez que limitarían sus costes y los tiempos que requieren. Un elemento fundamental para ello es hallar marcadores bioquímicos sencillos de cuantificar, que mejoren la toma de decisiones del personal sanitario en las diferentes fases de la terapia. En este sentido, la determinación de la actividad enzimática de peptidasas relacionadas con la regulación de la fisiología reproductiva y del desarrollo embrionario, como un factor de pronóstico del éxito gestacional sería de gran ayuda en la clínica reproductiva. La presencia en el semen humano de los enzimas de este estudio, APN, DPP IV, PEP y NEP, ha sido descrita, total o parcialmente, pero sus niveles de actividad no han sido vinculados hasta la fecha con la calidad de los embriones obtenidos ni con el éxito en la fecundación o la implantación embrionaria, aun cuando estas proteínas han demostrado ser elementos de relevancia en la regulación de diversos procesos de comunicación celular, tanto en la fisiología reproductiva como en otros sistemas.

Las actividades APN, PEP y NEP fueron descritas en diferentes fracciones seminales por este grupo de investigación (Fernández y cols., 2002) y asociadas a alteraciones seminales relacionadas con la infertilidad (Irazusta y cols., 2004; Valdivia y cols., 2004), pero no se ha relacionado ninguna de estas actividades seminales con indicadores de calidad embrionaria y éxito en las terapias de reproducción asistida. El hecho de poder acotar, a través de marcadores enzimáticos seminales sencillos de cuantificar, las

## Introducción

probabilidades de obtención de embriones de calidad mediante técnicas de reproducción asistida, facilitaría la labor y la toma de decisiones en las terapias reproductivas.

Recientemente, se han hallado indicios de la implicación de la APN espermática en el desarrollo de blastocistos derivados de las muestras seminales estudiadas (Gianzo y cols., 2022). Sin embargo, no se ha relacionado la actividad directa de esta enzima en las diferentes fracciones seminales con cada uno de los indicadores que, de manera más específica, determinan la calidad embrionaria.

La actividad NEP ha sido descrita en la fracción seminal de prostasomas (Fernández y cols., 2002), así como su presencia, de manera muy localizada, en la membrana del espermatozoide (Subiran y cols., 2008) asociada a la regulación de la motilidad espermática. Siendo esencialmente una endopeptidasa de membrana con un número limitado y específico de sustratos bioactivos sobre los cuales actúa (principalmente encefalinas y angiotensinas), relacionar los niveles de actividad seminal de esta enzima con indicadores de calidad embrionaria sugeriría una implicación muy precisa de estos sistemas peptídicos reguladores en procesos de desarrollo.

La PEP es principalmente un enzima presente en la fracción soluble citosólica. Cuenta, como en el caso de la NEP un número de sustratos diana limitado (angiotensinas y péptidos bioactivos como la TRH y su análogo el FPP, *fertilization promoting peptide*). Esta especificidad haría que resultados significativos en su actividad seminal, asociada a la fecundación y desarrollo embrionario, nos pusiera sobre la pista del papel en el desarrollo temprano de los sistemas de señalización en los que participa, sabiendo que esta enzima tiene relación con procesos de desarrollo más especializados en el desarrollo fetal (Agirregoitia y cols., 2010).

Por otra parte, la DPPIV es una endopeptidasa soluble poco estudiada hasta la fecha, en relación a la biología de la reproducción y la fertilidad. Se ha descrito su presencia en los prostasomas (Schrimpf y cols., 1999) pero no en otras fracciones seminales y no se le ha atribuido una función específica en relación a la fertilidad ni desarrollo embrionario. No obstante, algunos

de los péptidos sobre los que actúan pueden tener relevancia en los procesos reproductivos.

El hecho de poder acotar, a través de marcadores enzimáticos seminales sencillos de cuantificar, las probabilidades de obtención de embriones de calidad mediante técnicas de reproducción asistida, facilitaría la labor y la toma de decisiones en las terapias reproductivas.

En la Figura 2 se representa la localización subcelular de las mismas, así como la identificación del cromosoma en que se encuentra el gen que codifica para cada una de ellas y en la Tabla 1 aparecen mencionadas las cuatro peptidasas analizadas en este trabajo.

#### **1.7.5.1 Aminopeptidasa neutra (APN)**

La APN es una metaloproteína que pertenece a la familia M1 de aminopeptidasas. Es una aminopeptidasa situada en la membrana plasmática y con el centro activo orientado hacia el exterior celular (McLellan y cols., 1988; Riemann y cols., 1999). En ocasiones, también se puede encontrar de forma soluble en fluidos corporales tales como el plasma sanguíneo, el líquido seminal (Jung y cols., 1984; Erbeznik y Hersh, 1997; Antczak y cols., 2001; Fernández y cols., 2002; Ramón, 2011; Subirán y cols., 2011) y el líquido folicular (Roméu, 2014).

Presenta una amplia distribución, siendo abundante en el epitelio renal, el intestino delgado, la placenta, el hígado y en el cerebro, donde se le atribuye un papel en la hidrólisis e inactivación de encefalinas (Gross y cols., 1985; Matsas y cols., 1985). También actúa sobre otros péptidos, como encefalinas, angiotensinas, bradiquininas, citoquinas y quimocinas entre otras (Gross y cols., 1985; Matsas y cols., 1985).

Actúa preferentemente sobre péptidos en cuyo extremo aminoterminal hay un aminoácido neutro, como la alanina, a pesar de que también actúa sobre otros aminoácidos (McDonald y Barrett, 1986).

El gen que codifica para esta enzima (*ANPEP*) se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 15, ocupa 35 kb (Kruse y cols., 1988, Watt y

## Introducción

Willard 1990), y su expresión varía durante el crecimiento y la diferenciación celular (Riemann y cols., 1999).

Esta enzima presenta una actividad óptima a pH neutro y es activada por la presencia de DTT. Además de los agentes metaloquelantes, los agentes thiol-reactivos, bestatina y particularmente la amastatina provocan la inhibición de la APN (O'Cuinn, 1998; Riemann y cols., 1999; Sjöström y cols., 2000; Turner, 2004).

En relación a la presencia de la APN en el aparato reproductor femenino, esta enzima ha sido descrita en el ovario, la placenta y en el endometrio (Fujiwara, 2004). Además, estudios más recientes han propuesto que esta enzima podría afectar a la receptividad endometrial hacia los embriones (Shui y cols., 2019). Fernandez y colaboradores (2002) identificaron esta actividad enzimática en el semen humano, la cual fue asociada a indicadores de baja calidad seminal (Subiran y cols., 2008).

Recientemente, se han hallado indicios de la implicación de la APN espermiática en el desarrollo de blastocistos derivados de las muestras seminales estudiadas (Gianzo y cols., 2022). Sin embargo, no se ha relacionado la actividad directa de esta enzima en las diferentes fracciones seminales con cada uno de los indicadores que, de manera más específica, determinan la calidad embrionaria.

### **1.7.5.2 Dipeptidil-peptidasa IV (DPP IV)**

La dipeptidil-peptidasa IV es una exopeptidasa que pertenece a la familia S9 de peptidasas, en la que se engloba un grupo bastante variado de seril-aminopeptidasas. Esta enzima actúa liberando un dipéptido del extremo amino terminal de algunos oligopéptidos, siempre que el anteúltimo residuo corresponda a una prolina (o alanina aunque con menor afinidad) y el anterior no sea ni prolina ni hidroxiprolina (O'Cuinn, 1998; Pro y Dang, 2004). La identidad del último aminoácido no es crítica para la acción de esta enzima, siempre que tenga el grupo amino libre (Yoshimoto y cols., 1978).

Es una glicoproteína de membrana, que presenta un extremo amino terminal de tan sólo 6 aminoácidos hacia el citoplasma, un dominio

hidrofóbico que la ancla a la membrana y un gran dominio extracelular en el que se haya el centro activo. También se ha visto, que, en ocasiones, la pérdida del extremo amino terminal insertado en la membrana, puede originar su presencia en forma soluble en suero humano (Iwaki-Egawa y cols., 1998). Así, se ha descrito que esta enzima está involucrada en la activación e inactivación de un gran número de citoquinas y quimocinas (Havre y cols., 2008), entre los que se encuentran las hormonas GH y GHRH, las incretinas GLP1 (Glucagon Like Peptide 1) y 2, el neuropéptido Y, el péptido YY o la sustancia P (Abbott y cols., 1999). Además de su acción sobre péptidos bioactivos y su papel en el sistema inmune, esta aminopeptidasa tendría especial relevancia en el transporte específico de algunos dipéptidos y tripéptidos (Tiruppathi y cols., 1990).

La presencia de DPP IV ha sido descrita en diversos tejidos. En algunos de ellos, su presencia tiene lugar en una proporción bastante elevada, como en el riñón, intestino delgado o placenta (Rawlings y cols., 1991).

La DPP IV tiene una actividad óptima a pH 7,8 y posee un peso molecular de aproximadamente 110 kDa en su forma madura glicosilada. Puede ser inhibida por PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), diprotina A, bacitracina, puromicina y por los agentes thiol-reactivos: p-cloromercuribenzoato y N-etilmaleimida (O'Cuinn, 1998; Kikkawa y cols., 2005).

La DPP IV es una endopeptidasa soluble poco estudiada hasta la fecha, en relación a la biología de la reproducción y la fertilidad. Ha sido descrita en diferentes órganos del aparato reproductor femenino (Fujiwara, 2004) y se la implica en la formación del cuerpo lúteo en el ovario. También se ha descrito la presencia de esta enzima en el semen, concretamente en la fracción de prostasomas (Schrimpf y cols. 1999), aunque hasta la fecha no se le han atribuido funciones reguladoras en ningún proceso reproductivo. No obstante, algunos de los péptidos sobre los que actúa pueden tener relevancia en los procesos reproductivos. Incretinas como el GLP1, relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y la obtención de energía en las células, y que cuentan con receptor específico en la membrana de los espermatozoides (Rago y cols., 2020), son sustratos degradables por esta enzima. De hecho, existen estudios que indican que el tratamiento con

sitagliptina, inhibidor de la DPPIV podría mejorar la maduración ovocitaria (Dsaneshjou y cols., 2020).

### **1.7.5.3. Prolil-endopeptidasa (PEP)**

Junto a la DPP IV, la PEP es una enzima perteneciente a la familia S9 de las peptidasas del Clan S. Es una enzima citosólica que ha sido descrita además, como enzima sérica y de membrana (Gotoh y cols., 1988; O'Leary y cols., 1996; Szeltner y Polgár, 2008).

Esta endopeptidasa hidroliza péptidos en el residuo prolina interno, de su extremo carboxilo unido al péptido (Gass y Khosla, 2007). Inicialmente se descubrió su presencia en el útero, como enzima degradadora de oxitocina (Walter y cols., 1971), y en la actualidad se conoce su acción sobre otros péptidos bioactivos. Así, rompe específicamente la unión prolina, en péptidos tales como, sustancia P, vasopresina, neurotensinas, angiotensinas I y II, dinorfinas, bradiquininas, TRH, LHRH y hormona estimuladora de alfa-melanocitos (Welches y cols., 1991; Ito y cols., 2004; Ruiz-Ortega y cols., 2007; Myohanen y cols., 2011). Sin embargo, no es capaz de hidrolizar moléculas de mayor tamaño, por lo que su especificidad viene dada no sólo por la presencia del aminoácido prolina en la penúltima posición del extremo carboxilo terminal, sino que también viene determinada por el peso de la molécula.

Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, localizándose principalmente en músculo, testículo, riñón y glándula submaxilar (Gass y Khosla, 2007). Respecto a sus posibles funciones, se cree que participa en la regulación del metabolismo de las sustancias peptídicas mencionadas, y que su acción podría estar relacionada con la memoria y otros procesos neurológicos (Li y cols., 1996; Morain y cols., 2000, 2007; Agirregoitia y cols., 2003). A nivel reproductivo, se ha involucrado a PEP con la meiosis de los espermatoцитos, la diferenciación de las espermátidas, y motilidad de los espermatozoides (Kimura y cols., 2002). La presencia de la actividad PEP en el semen humano fue descrita por Valdivia y colaboradores (2004) asociándola a baja viabilidad espermática. Sin embargo, ha sido más recientemente cuando se ha han

detectado elevados niveles de expresión de esta proteína en el testículo y epitelio germinal de rata, asociados a toxicidad por metales pesados, y ha sido propuesta como posible marcador de fertilidad (Venditti y cols., 2020). Como ya se ha explicado con anterioridad esta enzima es capaz de degradar la hormona peptídica TRH, pero también puede actuar sobre péptidos análogos a esta como el *Fertilization Promoting Peptide* (FPP), presente en el semen y con funciones de activación de la capacitación espermática (Fraser, 2008). En cuanto a la fisiología de la reproducción femenina, se han descrito variaciones en la expresión de este enzima en el ovario, en el contexto de su papel como enzima convertora de angiotensina I a angiotensina 1-7 (Pereira y cols., 2020).

Se trata de una peptidasa monomérica de aproximadamente 75 kDa, cuya actividad resulta óptima en un pH entorno a 7,5. El incremento de dicha actividad es posible con NaCl, potasio, fosfato e iones nitrato. Por el contrario, resulta inhibida con Z-thio-prolina-thioprolinal (Gass y Khosla, 2007).

El gen *PREP*, que codifica para la enzima PEP, se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 6 (6q22), descrito por Goossens y cols. (1996a, 1996b).

#### **1.7.5.4. Endopeptidasa neutra (NEP)**

En su forma purificada aparece como una única cadena polipeptídica con un peso molecular aproximado de 90 kDa, que varía en función del grado de glicosilación de la misma (Malfroy y cols., 1988). En todos los tejidos arriba mencionados, aparece exclusivamente como una proteína integral de la membrana de tipo II, con el extremo amino terminal hacia la cara citoplásmica, un fragmento hidrófobo que la ancla a la membrana, y el centro activo, junto con la mayor parte de la enzima hacia el espacio extracelular.

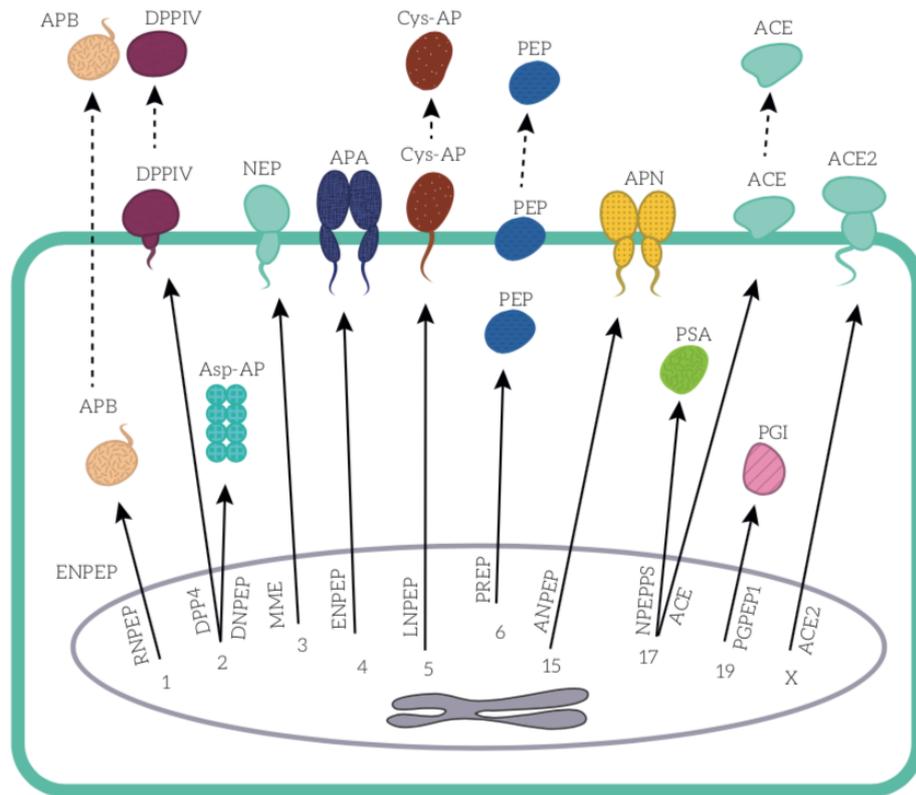
Además, la NEP presenta una zona de unión a  $Zn^{2+}$  hacia el espacio extracelular, aunque también es activada por otros cationes divalentes en un menor grado. Su actividad puede ser inhibida por quelantes metálicos (EDTA: ácido etileno diamino tetracético;  $\beta$ -mercaptoetanol y 1,10

## Introducción

fenantrolina), tioles (DTT), tiorfán y sus derivados. Su pH óptimo de actividad se da alrededor de 6 (Kerr y Kenny, 1974b; Roques y cols., 1980).

Sus principales sustratos *in vivo* parecen ser las encefalinas, taquicininas, sustancia P, endotelinas, bombesina, bradiquininas y angiotensina I (McLellan y cols., 1988; Roques y Beaumont, 1990; Ruiz-Ortega y cols., 2007).

La actividad NEP fue descrita por primera vez en el semen humano en la fracción de prostasomas por Fernandez y colaboradores (2002). Ha sido asociada a la regulación de la motilidad espermática mediada por taquicininas, sustratos portenciales de este enzima (Pinto y cols., 2010). Por otra parte, se ha hallado un péptido derivado de la proteína semenogelina, relacionada con la coagulación seminal, el péptido RSIY-11, que podría actuar como inhibidor endógeno de la NEP, afectando a la motilidad espermática (Fritz y cols. 2019). Niveles elevados de esta actividad en el semen también han sido relacionados a una mayor hiperactivación espermática (Turunen y cols., 2020), fenómeno característicamente asociado a la capacitación.



**Figura 2.** Representación grafica de las peptidasas. Localización celular (soluble en el citoplasma, de membrana o extracelular), cromosoma en el que se encuentra el gen que las codifica, así como la denominación del mismo (Blanco, 2010).

**Tabla 1. Clasificación jerárquica de las peptidasas objeto de estudio.** Las enzimas marcadas con (\*) son aquellas que han sido ampliamente descritas como marcadores tumorales. **M:** metaloendopeptidasa; **S:** seril-aminopeptidasa. **CALLA:** *common acute lymphoblastic leukemia-associated*. Tomado de *IUBMB Biochemical Nomenclature home page* (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>)

Tipo	Clan	Familia	Nº EC	Enzima
<b>M</b>	<b>MA</b>	<b>M1</b>	<b>3.4.1</b>	(*) APN, Alanil-aminopeptidasa de membrana, Aminopeptidasa microsomal, Aminopeptidasa M, Aminopeptidasa N, Aminopeptidasa unida a partículas, Amino-oligopeptidasa, Alanina aminopeptidasa, Aminopeptidasa de membrana I, Pseudoleucina aminopeptidasa, Aminopeptidasa específica de alanina, Cisteinilglicina-dipeptidasa, Cisteinilglicinasa, L-Alanil-aminopeptidasa, CD13
			<b>1.2</b>	
		<b>M13</b>	<b>3.4.2</b> <b>4.11</b>	(*) NEP, Neprilisina, Endopeptidasa neutra, Endopeptidasa 24.11, Peptidasa neutra del borde en cepillo de riñón, Encefalinasa (erróneo), Endopeptidasa 2, Antígeno CALLA, Endopeptidasa, Metaloendopeptidasa de membrana, Proteinasa neutra del borde en cepillo de riñón, Endopeptidasa-2, Glicoproteína CALLA, CALLA, Metaloendopeptidasa neutra, Metaloendopeptidasa de membrana, Endopeptidas neutra 24.11, CD10
<b>S</b>	<b>SC</b>	<b>S9</b>	<b>3.4.1</b>	(*) DPP IV , Dipeptidil-peptidasa IV, Dipeptidil aminopeptidasa IV, Xaa-Pro-dipeptidil-aminopeptidasa, Gly-Pro naftilamidasa, Postprolina dipeptidil aminopeptidasa IV, Antígeno de linfocito CD26, Glicoproteína GP110, Dipeptidil dipeptidasa IV, Glicilprolina aminopeptidasa, X-prolil dipetidil aminopeptidasa, Pep X, Antígeno de leucocito CD26, Glicilprolil dipeptidilaminopeptidasa, Dipeptidil-péptido hidrolasa, Glicilprolil aminopeptidasa, Dipeptidil-aminopeptidasa IV, DPP IV/CD26, Amino acil-prolil dipeptidil aminopeptidasa, Molécula Tp103 activadora de células T, X-PDAP
			<b>4.5</b>	
			<b>3.4.2</b> <b>1.26</b>	PEP, Prolil oligopeptidasa, Enzima de actuación post-prolina, Endopeptidas específica de prolina, Endopeptidasa post-prolina, Endoprolilpeptidasa, Prolil endopeptidasa

## **II. Objetivos**



## 2.1. Objetivo General

Analizar la relación entre las actividades enzimáticas APN, NEP, DPP IV y PEP en el semen humano y los indicadores de calidad seminal y embrionaria, y con las tasas de éxito en Terapias de Reproducción Asistida con el fin de valorar la utilidad de estas enzimas como parámetros predictivos en lo tratamientos de reproducción asistida.

## 2.2. Objetivos Específicos

1. Comparar los niveles de actividades enzimáticas de las peptidasas APN, NEP, DPP IV y PEP en diferentes fracciones del semen humano (espermatozoides, líquido seminal y prostasomas), con los parámetros de referencia de valoración de la calidad seminal propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).
2. Estudiar la correlación de los niveles de actividades enzimáticas de las peptidasas APN, NEP, DPP IV y PEP en diferentes fracciones del semen humano (espermatozoides, líquido seminal y prostasomas), con la tasa de fecundación.
3. Analizar la relación de los niveles de actividades enzimáticas APN, NEP, DPP IV y PEP en diferentes fracciones del semen humano (espermatozoides, líquido seminal y prostasomas) con los parámetros de evaluación de la calidad embrionaria (simetría, número de células y fragmentación embrionaria) obtenidos mediante ciclos de fecundación *in vitro*.
4. Establecer la implicación de los niveles de actividades enzimáticas APN, NEP, DPP IV y PEP de diferentes fracciones del semen humano (espermatozoides, líquido seminal y prostasomas) en la tasa de gestación, implantación y evolución del embarazo.



### **III. Materiales y Métodos**



### 3.1. Reactivos y productos

En este trabajo se han empleado los aparatos, soluciones, reactivos y productos que aparecen en la Tabla 2. Los medios de lavado y cultivo referentes al procesado tanto de gametos como de embriones son estándar y pertenecen Lifeglobal® Media de Lifeglobal® Group.

**Tabla 2. Aparatos, soluciones, reactivos y productos. (I)** Aparatos. Se representa el modelo y marca del aparato **(II)** Soluciones y su composición, (v/v) volumen/volumen, (p/v) peso/volumen. **(III)** Reactivos y productos. Se indica el proveedor, así como la ciudad y el país de origen. **(IV)** Medios de cultivo usados en los tratamientos de reproducción asistida.

<b>(I) Aparatos</b>	<b>Modelo. Marca</b>
<b>Centrífuga</b>	Labofuge 200. Heraeus
<b>Inmunoanalizador</b>	Mini Vidas. BioMérieux
<b>Ecógrafo</b>	SSD-620. Aloka
<b>Cabina de flujo laminar</b>	L 126 Dual. K system
<b>Estereomicroscopio – lupa</b>	SMZ 1000. Nikon
<b>Incubador</b>	C 200. Labotect
<b>Incubador</b>	C 60. Labotect
<b>Centrífuga</b>	203. Sigma
<b>Frigorífico</b>	TS-136.3, -18 °C. Teka
<b>Equipo de micromanipulación</b>	IM 188. Narishige Nikon
<b>Ultracongelador</b>	MDF-U5 186 S, -86 °C. Sanyo
<b>Ultracentrífuga</b>	Centrikon T2070, 4 °C. Kontron
<b>Estufa</b>	Hotcold S, 37 °C. Selecta
<b>Espectrofluorímetro</b>	RF-540. Shimadzu
<b>pH-metro</b>	Micro-pH 2002. Crison
<b>Mezclador magnético termoestable</b>	Agimatic-s. Selecta
<b>Homogeneizador Ultraturrax</b>	Miccra D1. ART
<b>Rotor de ángulo fijo</b>	TFT 45.6. Kontron
<b>Balanza de precisión</b>	R180D. Sartorius

<b>(II) Soluciones</b>	<b>Composición</b>
<b>Tampón Tris-HCl 0,2 M (pH 7,4)</b>	1000 ml H <sub>2</sub> O 24,22 g TRIZMA-base
<b>Solución homogeneización, Tris-HCl 10 mM</b>	5 % Tris-HCl 0,2 M
<b>Tampón Fosfato 0,1 M (pH 7,4)</b>	18,7 ml A + 81,3 ml B
<b>Fosfato A</b>	1000 ml H <sub>2</sub> O 27,6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O 0,2 M
<b>Fosfato B</b>	1000 ml H <sub>2</sub> O 28,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 M
<b>Tampón Acetato 0,1 M (pH 4,2)</b>	36,8 ml A + 13,2 ml B + 50 H <sub>2</sub> O
<b>Acetato A</b>	1000 ml H <sub>2</sub> O 11,55 ml CH <sub>3</sub> COOH 0,2 M
<b>Acetato B</b>	1000 ml H <sub>2</sub> O 27,22 g CH <sub>3</sub> COONa•3H <sub>2</sub> O 0,2 M

<b>(III) Reactivos y productos</b>	<b>Proveedor Ciudad, País</b>
<b>H-Gly-Pro-β-naftilamida</b> <b>Z-Gly-Pro-β-naftilamida</b> Dansyl-D-Ala-Gly-p-Nitro-Phe-Gly	<b>Bachem</b> Bubendorf, Suiza
<b>Ácido Etilen-diamino tetracético (EDTA)</b> <b>Cloruro de Manganeso (MnCl<sub>2</sub>)</b> <b>Acetato sódico trihidratado (CH<sub>3</sub>COONa•3H<sub>2</sub>O )</b> <b>Fosfato sódico dibásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b> <b>Fosfato sódico monobásico monohidrato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b> Cloruro sódico (NaCl)	<b>Merck</b> Darmstadt, Alemania
<b>Ala-β-naftilamida</b> <b>Seroalbúmina bovina(BSA)</b> <b>Dimetil-sulfóxido (DMSO)</b> <b>DL-ditiotreitrol (DTT)</b> <b>Cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>)</b> <b>Puromicina</b> <b>Tris (hidroximetil) aminometano (Tris-base)</b>	<b>Sigma-Aldrich</b> Steinheim, Alemania
<b>Ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH)</b>	<b>Probus</b> Badalona, España
<b>Ácido clorhídrico (HCl)</b>	<b>Panreac</b> Barcelona, España

<b>(IV) Medios de Cultivo</b>	<b>Proveedor</b>
<b>Gradientes de densidad</b>	Puresperm
<b>Global W/HEPES</b>	LIFE GLOBAL
<b>Global for Fertilitation</b>	LIFE GLOBAL
<b>Global</b>	Life Global
<b>HSA</b>	Life Global

### 3.2. Obtención del tejido biológico empleado

Todas las muestras seminales analizadas proceden de 115 pacientes que son sometidos a tratamientos de reproducción asistida en la Clínica IVI Bilbao. En la Tabla 3 se expresa la edad de los pacientes estudiados, así como su distribución por sexos.

**Tabla 3.** Distribución por edad y sexo de los sujetos a estudio

	<b>Media</b>	<b>SD (<math>\pm</math>)</b>	<b>Valor Mínimo</b>	<b>Valor Máximo</b>
<b>EDAD MUJER (AÑOS)</b>	37.06	4.09	29	48
<b>EDAD HOMBRE (AÑOS)</b>	38.05	4.56	28	52

Las muestras seminales se procesan inmediatamente después de su obtención mediante una centrifugación de 10 min a 600 g., separando de esta manera la fracción celular del líquido seminal. Estas fracciones separadas se conservan en un ultracongelador MDF-U5 186 S (Sanyo) a -80 °C.

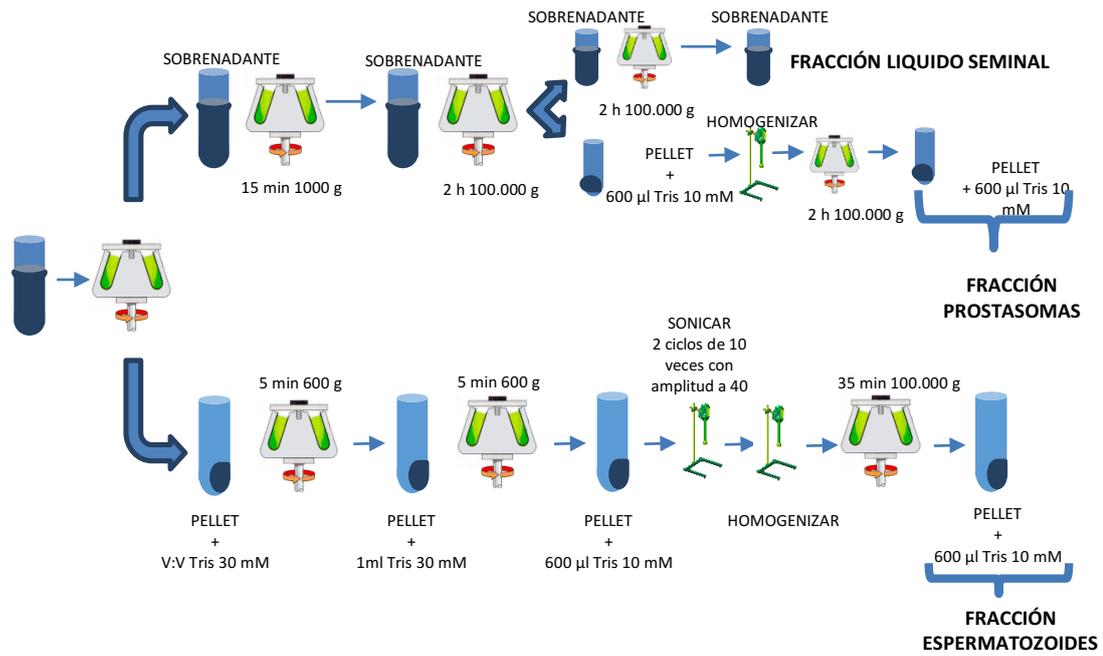
### **3.3. Fraccionamiento de la muestra**

Las dos muestras que se obtienen de cada paciente, líquido seminal y fracción celular se procesan por separado, manteniendo durante todo el proceso una temperatura constante de 4°C.

Al procesar la fracción de líquido seminal se va a obtener dos fracciones, la de líquido seminal propiamente dicho y la de prostasomas. Para ello se deben realizar diferentes centrifugaciones. La primera es una centrifugación de 15 min a 1000 g de donde se va a recoger el sobrenadante. Este sobrenadante se centrifuga 2 horas a 100.000 g. De esta centrifugación se van a usar las fracciones tanto el sobrenadante como el pellet. El sobrenadante se centrifuga 2 horas a 100.000 g dándonos lugar a la fracción de líquido seminal final y el pellet se resuspende en 600 µl de Tris 10 mM, se centrifuga 2 horas a 100.000 g y el pellet se vuelve a resuspender en 600 µl de Tris 10 mM obteniendo así la fracción de prostasomas.

La fracción celular la se va a diluir con el mismo volumen de Tris 30 mM y se va centrifugar 5 min a 600 g, el pellet se va a resuspender en 1 ml de Tris 30 mM y se va centrifugar 5 min a 600 g, el pellet se va a resuspender en 600 µl de Tris 10 mM. En este paso hay que sonicar y volver a centrifugar 35 min a 100.000 g, el pellet se resuspende en 600 µl de Tris 10 mM y ya se tiene preparada la fracción de espermatozoides.

Estas fracciones separadas se conservan en un ultracongelador MDF-U5 186 S (Sanyo) a -80 °C (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema del protocolo de separación de la muestra seminal en las fracciones de espermatozoides, líquido seminal y prostosomas.

### **3.4. Análisis de la actividad peptidásica**

#### **3.4.1. Preparación de las muestras seminales**

En las muestras obtenidas se analizó la actividad de 4 enzimas (APN, DPP IV; PEP Y NEP) con actividad peptidásica. Dicha actividad se determinó en tres fracciones, espermatozoides, líquido seminal y prostasomas. Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron a 4°C. Al descongelar las muestras, estas se sometieron a un proceso de homogenización con ayuda de un homogenizador PZR 50 (Heidolph).

#### **3.4.2. Determinación de la cantidad de proteína**

La proteína total de las muestras se determinó mediante el método Bradford y cols., (1976). Para ello, se añadieron 2 ml del reactivo Bradford (azul brillante Coomassie 0,117 mM, etanol al 5% y ácido ortofosfórico al 15%) a 10 µl de muestra de cada una de las fracciones separadas con anterioridad. Transcurridos 10 min se leyó la absorbancia a una longitud de onda de emisión de 595 nm en un espectrofotómetro UV-2401 PC (Shimadzu). Se empleó una recta patrón usando concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA).

#### **3.4.3. Ensayos enzimáticos**

Se analizó la actividad peptidásica de las tres fracciones obtenidas espermatozoides, líquido seminal y prostasomas. Todos los ensayos enzimáticos realizados estaban basados en técnicas espectrofluorimétricas. Tras la puesta a punto de los métodos enzimáticos en el Laboratorio, se comprobó que 10 µl de fracción de muestra, preparada como previamente se ha mencionado, ofrecían una cantidad de proteína de, aproximadamente, 10 mg. Esta concentración se situaba aproximadamente en la región intermedia de la recta patrón realizada con BSA. Así, tras determinar la cantidad de proteína, en caso necesario se diluyó con tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4 hasta obtener la cantidad de proteína mencionada.

La reacción se inició al añadir 1 ml de sustrato artificial fluorogénico (Tabla 4) sobre la muestra, y permitir que transcurriera la reacción durante 30 min a 30 °C. La reacción se detenía por la adición de 1 ml de tampón acetato 0,1 M a pH 4,2. La actividad enzimática de las peptidasas, se determinó en todos los casos por métodos espectrofluorimétricos, para lo que se empleó un espectrofluorímetro RF-540 de Shimadzu.

Todas las muestras se analizaron por triplicado y se calculó la media y la desviación estándar. Los valores obtenidos espectrofluorimétricamente se transformaron en picomoles de metabolito liberado mediante extrapolación, por ajuste no lineal de los datos a una ecuación de regresión calculada a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas. Posteriormente, estos datos fueron convertidos en unidades de actividad peptidásica (UP), definiéndose dicha unidad como la cantidad de enzima que hidroliza un picomol de sustrato por minuto. Los resultados finales se expresaron como actividad específica (unidades de actividad peptidásica/miligramo de proteína en la muestra).

**Tabla 4.** Composición de las disoluciones empleadas en la determinación de la actividad enzimática.

(A)	Sustrato	(mM)	Otros compuestos				
			pH	DTT (mM)	EDTA (mM)	NaCl (mM)	Puromicina ( $\mu$ M)
<b>PEP</b>	Z-Gly-Pro- $\beta$ -NA	0,125	7,4	2	-	-	-
<b>APN</b>	Ala- $\beta$ - NA	0,125	7,4	0,65	-	-	40

(B)	Sustrato	(mM)	Otros compuestos			
			pH	MnCl <sub>2</sub> (mM)	Captopril (nM)	
<b>NEP</b>	N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO <sub>2</sub> -Phe-Gly	0,125	7,4	-	4,6	
<b>DPPIV</b>	H- Gly-Pro- $\beta$ - NA	0,2	8,3	-	-	

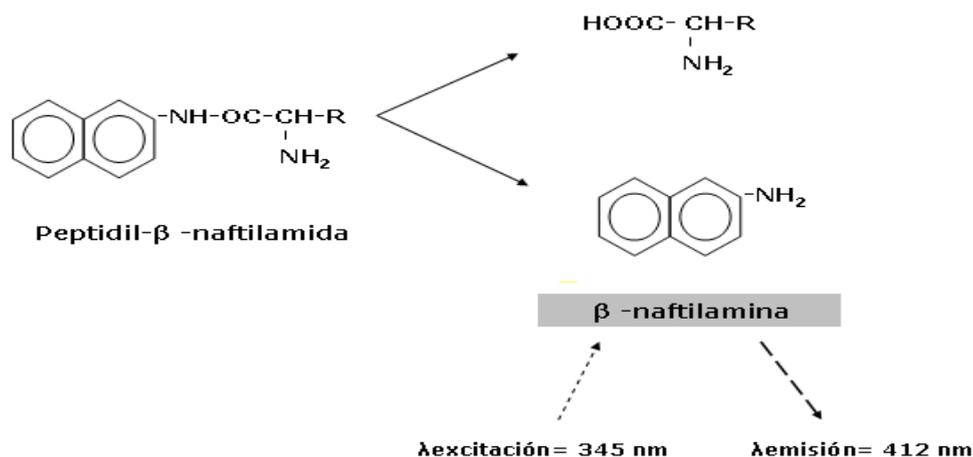
En todos los casos contenían BSA, en una concentración de 0,1 mg/ml. **(A)** sustratos preparados en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4. **(B)** sustratos preparados en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. NA: naftilamida.

### 3.4.3.1. Ensayos enzimáticos empleando $\beta$ -naftilamidas como sustrato

Para analizar la actividad peptidásica de APN, DPP IV, y PEP se usaron sustratos del tipo peptidil- $\beta$ -naftilamida o aminoacil- $\beta$ -naftilamida.

Se emplearon 10  $\mu$ l de muestra, según las condiciones descritas para la preparación de la misma en el apartado 3.1, correspondiente tanto a la APN, DPP IV y PEP. Los controles se realizaron con extracto enzimático y sustrato  $\beta$ -naftilamida que se encontraban en presencia de ácido acético con el fin de que no fuera posible la reacción. Para obtener los valores de los blancos se utilizó tampón.

La presencia de actividad peptidásica en la muestra hace que la aminoacil- $\beta$ -naftilamida se rompa liberando aminoácidos libres y moléculas de  $\beta$ -naftilamina como muestra la Figura 4. Esta última molécula tiene la particularidad de ser fluorescente, emitiendo energía a una longitud de onda de 412 nm cuando es excitada a 345 nm. Así, empleando rectas patrón de  $\beta$ -naftilamida es posible conocer la actividad enzimática de las peptidasas arriba mencionadas, teniendo en cuenta que una unidad peptidásica (UP) cataliza la formación de 1 picomol de  $\beta$ -naftilamida/min, en las condiciones del ensayo descritas.



**Figura 4.** Esquema de la hidrólisis del sustrato de peptidasa en el ensayo enzimático.

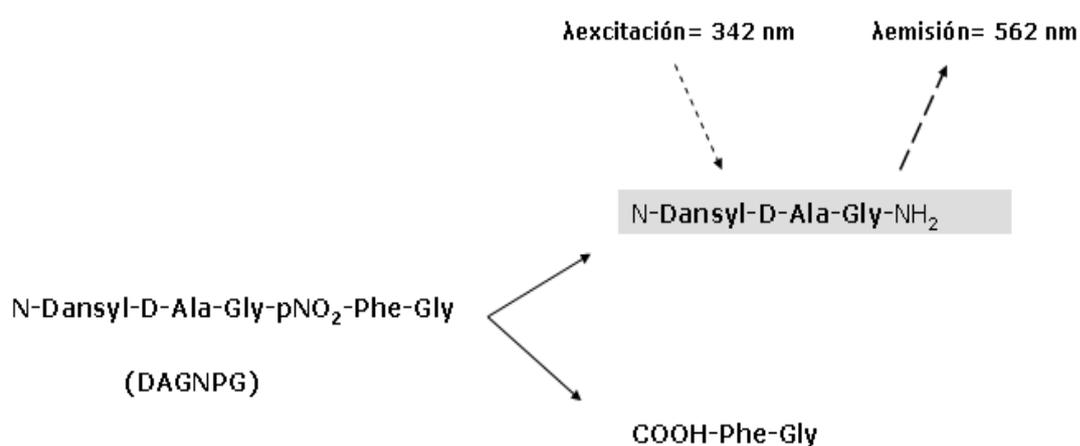
*Uno de los productos obtenidos,  $\beta$ -naftilamina, emite fluorescencia a 412 nm cuando es excitado a 345 nm.*

### 3.4.3.2. Ensayo enzimático empleando DAGNPG (N-Dansyl-D-Ala-Gly-p-Nitro-Phe-Gly) como sustrato

Para la determinación de la actividad enzimática de NEP se empleó un método fluorimétrico basado en la utilización de DAGNPG (N-Dansyl-D-Ala-Gly-(p-Nitro)-Phe-Gly) como sustrato artificial fluorogénico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

En este caso, se incubaron 100  $\mu$ l de Fracción Membrana con 1 ml de sustrato durante 30 min a 37 °C. NEP actúa sobre el enlace nitro-fenil, Gly-(pNO<sub>2</sub>)-Phe, en la secuencia peptídica. En el DAGNPG, la fluorescencia nativa del grupo Dansil está apantallada por la proximidad espacial del grupo (pNO<sub>2</sub>)Phe. De esta manera, cuando el péptido N-Dansyl-D-Ala-Gly (DAG) es liberado por la acción enzimática se produce un aumento de la fluorescencia que puede ser detectada y cuantificada a 562 nm tras ser excitada a 342 nm (Figura 5).

Así, empleando rectas patrón de DAG es posible conocer la actividad enzimática de NEP, teniendo en cuenta que una unidad peptidásica (UP) cataliza la formación de 1 picomol de DAG/min, en las condiciones del ensayo descritas.



**Figura 5.** Esquema de la hidrólisis del sustrato de NEP en el ensayo enzimático.

*Uno de los productos obtenidos, Dansyl-D-Ala-Gly, emite fluorescencia a 562 nm cuando es excitado a 342 nm.*

### **3.5. Análisis de los parámetros de calidad seminal**

Consiste en evaluar los parámetros descriptivos clásicos en una muestra obtenida por masturbación. Las características que se han de valorar en el análisis de semen son: concentración espermática, movilidad y morfología, según criterios del año 2010 de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

#### **3.5.1. Concentración espermática**

La concentración espermática son los millones de espermatozoides que hay por mililitro de semen. Para el recuento de los espermatozoides se utiliza una cámara Makler que consta de una cuadrícula de 1 mm<sup>2</sup> dividida en 100 cuadros, con una profundidad de 10 µm. Los espermatozoides contados en 10 de estos cuadrados corresponden a una concentración de millones por mililitro.

Para realizar este análisis se siguieron los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) donde un valor de normalidad es de 15 millones de espermatozoides por cada mililitro de volumen eyaculado o 39 millones en la totalidad de la muestra. Si no se alcanzaran esos valores hablaríamos de Oligozoospermia y en los casos más severos de Criptozoospermia (<100.000 espermatozoides por ml).

#### **3.5.2. Movilidad espermática**

Se lleva a cabo el recuento de espermatozoides, móviles e inmóviles en varios campos seleccionados al azar y con un objetivo de 20 aumentos en una cámara Makler. Se deben de contar no menos de 100 espermatozoides. Existen tres categorías de espermatozoides en función de la movilidad que presentan.

- *Progresivos*: Se desplazan.
- *No Progresivos*: Se mueven, pero no se desplazan.
- *Inmóviles*: No se mueven.

## Materiales y métodos

Para realizar este análisis se siguieron los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) donde se valora el porcentaje de espermatozoides móviles y el de progresivos. Los móviles progresivos deben superar el 32% de lo contrario se denomina Astenozoospermia.

### 3.5.3. Morfología espermática

En el espermatozoide se pueden distinguir tres regiones:

- *Cabeza*: debe ser lisa, sin irregularidades y oval. Tiene que disponer de un acrosoma bien definido que ocupe entre el 40 y el 70% del área de la cabeza. El acrosoma no debe mostrar vacuolas.
- *Pieza intermedia*: debe ser delgada, regular y de la misma longitud que la cabeza.
- *Cola*: solo debe tener una, recta, con un calibre uniforme en toda su longitud y algo más fina que la pieza media.

La valoración de estos parámetros se realizó mediante una tinción Diff-Quick®, para ello se realizan los siguientes pasos.

- Extensión de 5-10 µl de semen en un portaobjetos.
- Dejar secar al aire.
- Teñir con los colorantes.
- Observar con el objetivo (100x) y aceite de inmersión.
- Evaluar 200 espermatozoides.

Para ello se siguieron los criterios de morfología espermática de la Organización Mundial de la Salud (OMS) donde un espermigrama normal debe tener igual o más del 4 % de espermatozoides normales. Si se encuentra por debajo de este valor se considera Teratozoospermia.

### **3.6. Capacitación espermática**

Este concepto se refiere a la mejora e incremento del potencial de fertilidad de los espermatozoides. Por lo tanto, esta recuperación de espermatozoide móviles se relaciona con la facilidad de adquirir la capacidad de fecundar (Mortimer y cols., 1998).

El método usado para la capacitación es el de gradientes de densidad. Se fundamenta en la selección de los espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presentan los gradientes de densidad del 90 y 45 % y llegar hasta el fondo del tubo. Su procedimiento es el siguiente.

- Deslizar un volumen determinado de medio de gradiente de 90% impregnando las paredes hasta el fondo de un tubo cónico.
- Depositar el mismo volumen de gradiente de 45%.
- Depositar 1 ml de semen.
- Centrifugar 20 min a 1400 rpm y, posteriormente, con una pipeta Pasteur, recuperar el sedimento, que será lavado con medio de cultivo a 2000 rpm durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender con un volumen de medio de cultivo a determinar según el pellet que se haya creado.
- Volver a evaluar la muestra, donde se vuelve a valorar tanto la concentración como la movilidad espermática post-capacitación.

### **3.7. Punción folicular y recuperación de ovocitos**

El objetivo de este procedimiento es recuperar los ovocitos contenidos en los líquidos foliculares de las pacientes, mediante punción ecoguiada en el quirófano y posterior búsqueda en el laboratorio de los ovocitos que contiene el líquido folicular (Dellenbach y cols., 1984; Gleicher y cols., 1983).

La punción folicular se realiza en quirófano, de este van a llegar los tubos con líquido folicular al laboratorio. Este líquido se vierte sobre placas Petri precalentadas y se buscan los complejos cumulo-corona-ovocito. Esta búsqueda se realiza con la ayuda de una lupa a 8-10 aumentos.

Los ovocitos recuperados se lavan en una placa con medio de cultivo y se quitan las partes necróticas y con restos de sangre de la granulosa.

Estos ovocitos se depositan en otra placa con medio de cultivo en un incubador a 37°C y 6.5 % de CO<sub>2</sub> donde van a permanecer hasta el momento de la inseminación o de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides.

### **3.8. Inseminación de ovocitos**

Consiste en la fecundación del ovocito en condiciones de cultivo *in Vitro*, previa obtención y preparación de los gametos para la posterior transferencia de los embriones a la cavidad uterina.

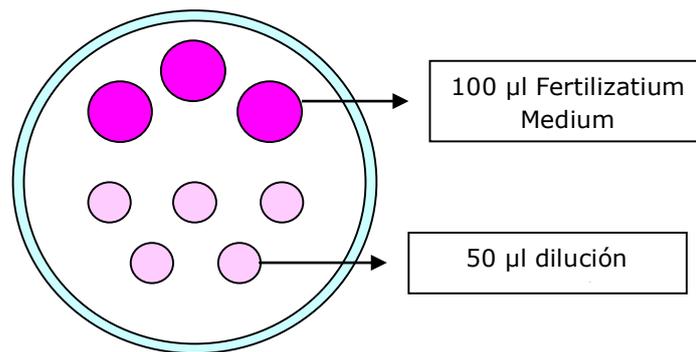
#### **3.8.1. Preparación de la dilución de inseminación**

Para llevar a cabo la inseminación se necesita capacitar el semen utilizando gradientes de densidad. Una vez capacitado hay que realizar una dilución de 80.000 espermatozoides móviles progresivos por mililitro (EMP/ml) y teniendo en cuenta que el volumen final que se obtenga tiene que ser suficiente para preparar una gota de 50 µl para cada ovocito.

### 3.8.2. Preparación de las placas de inseminación

Las placas de inseminación constan de microgotas de lavado y de inseminación (Figura 6).

- Tres gotas de 100  $\mu$ l de medio Fertilizatum Medium® gaseado del día anterior.
- Gotas de inseminación de 50  $\mu$ l de dilución seminal.



**Figura 6.** Ejemplo de la disposición de una placa de inseminación.

### 3.8.3. Procedimiento de inseminación de los ovocitos

Tras 4 y 6 horas depuse de la punción folicular se procede a la inseminación. La inseminación se realiza con una pipeta Pasteur previamente flameada con la que se pasa cada complejo corona-cúmulo-ovocito (CCOO) a una gota de la dilución.

Se deja la placa en el incubador durante 17-20 horas.

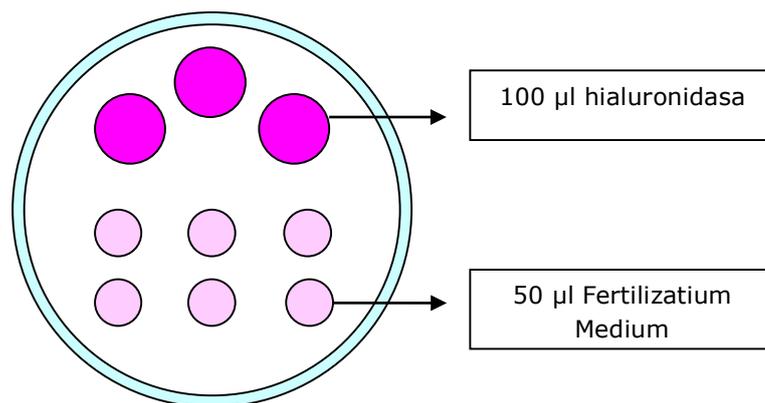
### 3.9. Preparación de los ovocitos para la microinyección intracitoplasmática

Los ovocitos que son utilizados para microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) deben pasar por un proceso de decumulación, en el cual se eliminan las células del cúmulo del ovocito (Van de Velde H y cols., 1998). La eliminación de las células del cúmulo se realiza entre 2 y 4 horas después de la punción folicular. Se lleva a cabo usando una dilución de hialuronidasa al 50% y pipetas de varios diámetros (Joris H y cols., 1998). La decumulación nos permite conocer la madurez nuclear del ovocito, y utilizar únicamente los que se encuentran en el estadio de metafase II (MII), que se evidencia por la presencia del primer corpúsculo polar (Rienzi L y cols., 1998).

#### 3.9.1. Preparación de las placas de hialuronidasa

Las placas de hialuronidasa constan de microgotas con la dilución hialuronidasa y Fertilizatum Medium® (Figura 7).

- Tres gotas de 100  $\mu$ l con hialuronidasa al 50%
- 6 gotas de Fertilizatum Medium®



**Figura 7.** Ejemplo de la disposición de una placa de decumulación.

### 3.9.2. Decumulación de los ovocitos

Pasar el complejo corona-cúmulo-ovocito, por las gotas de hialuronidasa donde este cúmulo se empezará a disgregar. Ir cambiando las pipetas cada vez de menos tamaño para acabar de quitar todas las células del cúmulo en las gotas de Fertilizantium Medium®.

### 3.9.3. Clasificación de la maduración nuclear ovocitaria

Se van a encontrar tres grados de madurez diferentes (Figura 8).

- *Ovocitos con estadio de vesícula germinal*: ovocitos en los que se observa la presencia de la vesícula germinal.
- *Ovocitos en estadio de Metafase I*: ovocitos en los que no se observa el primer corpúsculo polar y ha desaparecido la vesícula germinal.
- *Ovocitos en estadio de Metafase II*: son ovocitos en estado preovulatorio, en los que se observa la presencia del primer corpúsculo polar.



**VG**



**MI**



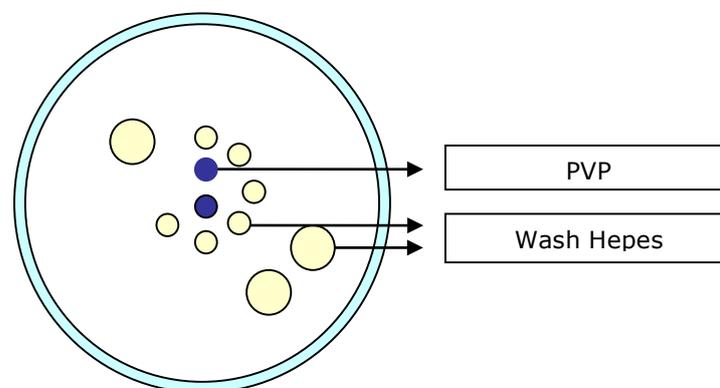
**MII**

**Figura 8.** Imagen donde se observa un ovocito en estadio de vesícula germinal (VG), un ovocito en estadio de metafase I (MI) y un ovocito en estadio de metafase II (MII).

### 3.10. Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides

Consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito decumulado. Una vez decumulado los ovocitos y se han capacitado los espermatozoides se procede a la placa de ICSI. La placa de ICSI consta de (Figura 9):

- Dos gotas de 7  $\mu$ l de polovinilpirrolidona (PVP) cuyas características son su alta viscosidad e incompresibilidad, cualidades que, por un lado, impiden moverse rápidamente a los espermatozoides y posibilitan su manipulación.
- Seis gotas de 10  $\mu$ l de Fertilizantium Medium® atemperado para colocar los ovocitos.
- Tres gotas de 20  $\mu$ l de Fertilizantium Medium® atemperado para lavar los ovocitos antes de colocarlos en cada una de las gotas.



**Figura 9.** Ejemplo de la disposición de una placa de microinyección intracitoplasmática.

Para poder comenzar la microinyección necesitamos colocar las pipetas en el microinyector una de Holding con la que se sujeta el ovocito y una de ICSI con la que se va a microinyector el espermatozoide.

La inmovilización del espermatozoide, previa rotura de su flagelo, es necesaria tanto para facilitar la manipulación del espermatozoide y para que no destruya las estructuras del ovocito una vez que este dentro de éste, como para facilitar la descondensación del núcleo (Palermo GD y cols., 1996). Después de la inmovilización se procede a la microinyección del espermatozoide dentro del ovocito colocando el corpúsculo polar en la posición horaria de las 12:00 horas o las 6:00 horas, ya que la posición del corpúsculo polar indica cuál puede ser la posición del huso meiótico (Nagy y cols., 1995; Blake y cols., 2000).

### 3.11. Valoración de la fecundación

Consiste en valorar que se ha producido la fecundación correcta con la observación bajo microscopio óptico de la presencia de dos corpúsculos polares y dos pronúcleos. Esto es visible 17-20 horas después de la inseminación (Figura 10).

La evaluación de la fecundación tras fecundación *in vitro* convencional se realiza tras liberar los ovocitos de las células del cumulo con ayuda de un capilar de 140  $\mu\text{m}$ . Una vez liberados los ovocitos del cumulo se valoran al igual que los que provienen de microinyección intracitoplasmática. Esta valoración se lleva a cabo con un microscopio invertido a 400 aumentos.



**Figura 10.** Imagen donde se observa un ovocito fecundado.

### **3.12. Valoración de calidad embrionaria**

Consiste en evaluar las características embrionarias que nos van servir para poder clasificar los embriones en el laboratorio y poder tomar una decisión sobre su destino.

Según Sela y cols., (2012) la clasificación embrionaria que predice el potencial implantatorio del embrión se establece combinando el grado de fragmentación, el número de blastómeros y el patrón de división en día 2 y 3 de desarrollo.

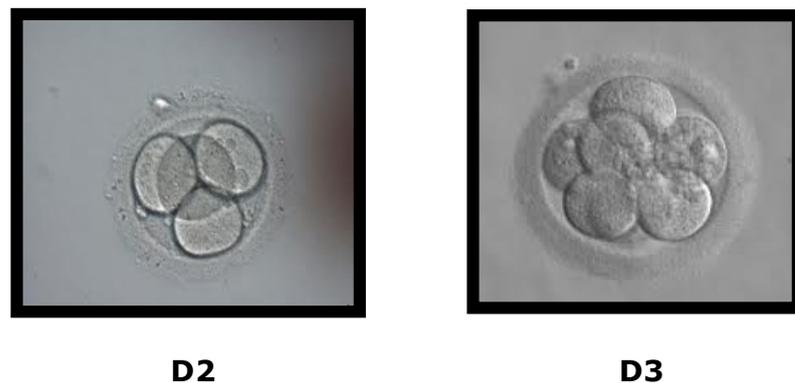
Los embriones se observan en un microscopio invertido a 600 aumentos, con un objetivo de contraste modular y pletina calefactada. Es necesario observarlos cada 24 horas para distinguir los distintos tipos de evolución.

Para realizar la valoración embrionaria se siguió la clasificación embrionaria y las recomendaciones que se proponen en los criterios de calidad embrionaria ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) obtenidos de datos bibliográficos unido a un estudio multicéntrico de validación del criterio (Pons y cols., 2014). Los resultados del trabajo de Pons demuestran que la calificación de ASEBIR tienen valor pronostica tanto en la tasa de implantación como para la tasa de nacido vivo, ya que dichas tasas aumentan gradualmente según la categoría embrionaria, siendo máximas en los embriones de categoría A y mínimas en los de categoría D.

#### **3.12.1. Número de células**

La valoración de la morfología embrionaria incluye la observación del embrión en el segundo día de cultivo (D2). Dicha observación debe realizarse  $44 \pm 1$  horas después de la inseminación (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). En este momento los embriones óptimos serán aquellos que presenten 4 células (Munné, 2006; Holte y cols., 2007; Scott y cols., 2007) (Figura 11).

Si el cultivo embrionario continúa, el siguiente momento de observación es en D+3, a las  $68 \pm 1$  horas después de la inseminación (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). En este momento los embriones con mayor probabilidad de implantación serán aquellos que presenten 7-8 células y que a su vez procedan de 4 células en D2 (Racowsky y cols., 2011) (Figura 11).



**Figura 11.** Imagen donde se observa un embrión en día 2 de desarrollo (D2) y un embrión en día 3 de desarrollo (D3).

### **3.12.2. Fragmentación embrionaria**

Podemos definir un fragmento celular como una estructura anuclear, formada por citoplasma delimitado por una membrana celular, de origen blastomérico, con un tamaño de  $<45\mu\text{m}$  de diámetro en día 2 de desarrollo y  $<40\mu\text{m}$  en día 3 de desarrollo (Prados y cols., 2012).

La presencia de fragmentos en los embriones humanos cultivados *in vitro* ocurre con cierta frecuencia; hasta el momento solo se ha podido observar en la especie humana y no siempre se correlaciona con una tasa de implantación baja.

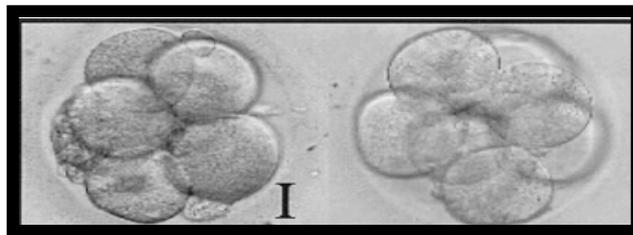
La fragmentación en los estadios tempranos del desarrollo reduce la viabilidad del embrión debido a anomalías que acaban provocando un bloqueo embrionario, por lo general antes de llegar a la blastulación (Racowsky y cols., 2009; Pelinck y cols., 2010). Actualmente todos los

## Materiales y métodos

estudios coinciden en que la fragmentación es un parámetro morfológico importante para establecer la clasificación embrionaria y mayoritariamente se evalúa en día 2 y 3 de desarrollo.

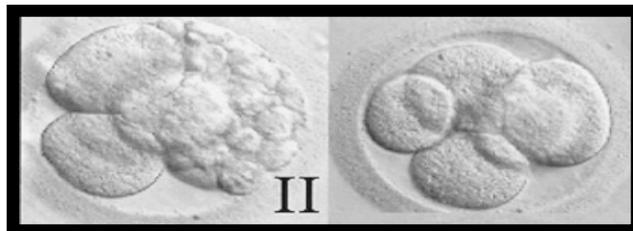
Según la cuantificación y la distribución tenemos cinco tipos de fragmentación (Alikani y cols., 1999).

- *Tipo I*: Menos de 5% de fragmentación asociada a una blastómera (Figura 12).



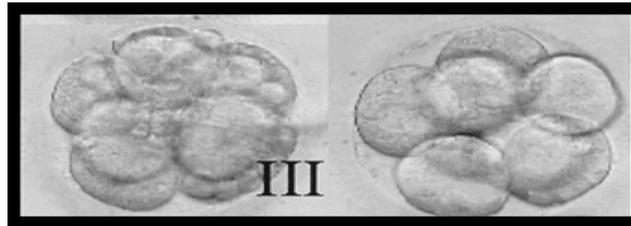
**Figura 12.** Imagen donde se observa un embrión con fragmentación tipo I.

- *Tipo II*: Fragmentos localizados en una zona del embrión, que corresponden a la fragmentación parcial o completa de una blastómera (Figura 13).



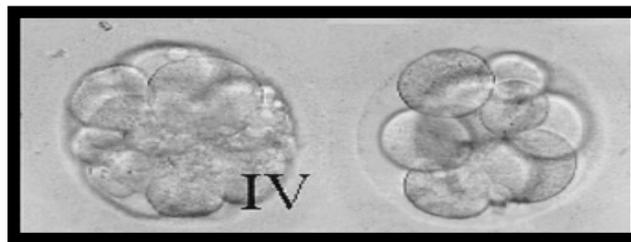
**Figura 13.** Imagen donde se observa un embrión con fragmentación tipo II.

- *Tipo III*: Fragmentos pequeños y distribuidos por todo el embrión, entre las blastómeras o periféricamente (Figura 14).



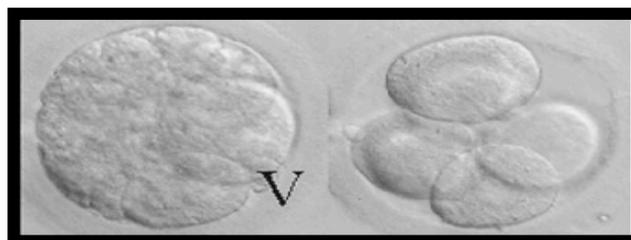
**Figura 14.** Imagen donde se observa un embrión con fragmentación tipo III.

- *Tipo IV*: Fragmentos grandes que parecen blastómeras distribuidos por todo el embrión y asociados a blastómeras irregulares (Figura 15).



**Figura 15.** Imagen donde se observa un embrión con fragmentación tipo IV.

- *Tipo V*: Fragmentos necróticos granulares asociados a blastómeras con el citoplasma contraído (Figura 16).



**Figura 16.** Imagen donde se observa un embrión con fragmentación tipo V.

## Materiales y métodos

Cuando predominan fragmentos de gran tamaño repartidos por todo el embrión, que pueden confundirse con células pequeñas, las posibilidades de implantación son escasas. Este patrón de fragmentación es el denominado Tipo IV (Alikani y Cohen, 1995)

Existe un mayor número de anomalías cromosómicas en embriones que presentan una fragmentación dispersa por todo el volumen embrionario, en comparación con aquellos en los que se encuentra localizada (Magli y cols., 2007).

El volumen que ocupan los fragmentos respecto al volumen total del embrión, donde porcentajes bajos de fragmentación (hasta un 10%) no parecen influir significativamente en el potencial implantatorio del embrión, así como tampoco en la tasa de embarazo, mientras que un elevado porcentaje de fragmentos (40%) reduce mucho el potencial de implantación del embrión (Alikani y cols., 2000)

### **3.12.3. Simetría celular**

Cuando el cigoto realiza las primeras divisiones mitóticas, sus células no siempre se dividen simétrica y sincrónicamente. Un embrión con divisiones simétricas y sincrónicas presentará 2, 4, 8 o 16 células de tamaño similar, con una ausencia casi total de periodos de tiempo en los que se muestren estadios de división intermedios. En cambio, un embrión con divisiones simétricas, pero asincrónicas, presentará células de tamaño diferente durante periodos de tiempo considerables, porque corresponden a ciclos celulares diferentes; por ello debe ser considerado como un embrión "estadio-específico" y no como un embrión con células "desiguales", por lo que su categoría morfológica no debe ser penalizada. El concepto de desigualdad en el tamaño de los blastómeros está relacionado exclusivamente con las divisiones asimétricas, de tal manera que, por ejemplo, un embrión de 5 células de tamaño semejante no es "estadio-específico" (Prados y cols., 2012), y debería ser clasificado como un embrión con células desiguales, mientras que un embrión de 5 células con 3 grandes (en el segundo ciclo de división) y 2 pequeñas (en el tercer ciclo de división) sí que sería "estadio-específico" y debería ser valorado como

un embrión con células iguales. En definitiva, y para evitar errores de concepto, se recomienda utilizar la nomenclatura siguiente para definir la simetría celular de los embriones:

- Embrión estadio-específico, sería aquel cuyas células presenten todas un tamaño acorde con su ciclo de división.
- Embrión no estadio-específico, sería aquel que contenga células cuya relación de tamaños sea incompatible con su ciclo de división.

Según diversos autores, la falta de simetría en la división de los blastómeros se asocia con una disminución en la capacidad implantatoria (Steer y cols., 1992; Veeck, 1999; Van Blerkom y cols., 2000; De Placido y cols., 2002; Hnida y cols., 2004).

Según la simetría de las blastómeras podemos clasificar los embriones:

- *Simetría 1*: embriones en estadio específico.
- *Simetría 2*: embriones en no estadio-específico con blastómeras de dos tamaños diferentes.
- *Simetría 3*: embriones en no estadio-específico con blastómeras de tres tamaños diferentes.
- *Simetría 4*: embriones en no estadio-específico donde se observa una célula dominante.

Para poder realizar el estudio estadístico se han hecho diferentes grupos:

- *Grupo 1*: valores de 0.5 a 1.5 de simetría.
- *Grupo 2*: valores de 1.5 a 2.5 de simetría.
- *Grupo 3*: valores de 2.5 a 3.5 de simetría.
- *Grupo 4*: valores de 3.5 a 4.5 de simetría.

### **3.12.4. Multinucleación**

La visualización de los núcleos en la práctica diaria en los laboratorios de reproducción asistida es un procedimiento que debe seguir siendo considerado de gran importancia en la valoración morfológica de los embriones.

Además, se ha observado que la visualización de un núcleo único por blastómero es un buen predictor del potencial de implantación (Moriwaki y cols., 2004; Saldeen y Sundström, 2005).

La multinucleación se define como la presencia de más de un núcleo en al menos uno de los blastómeros de un embrión (Jackson y cols., 1998; Staessen y Van Steirteghem, 1998; Van Royen y cols., 2003; Elder y Cohen, 2007); se puede evaluar en diferentes momentos del desarrollo embrionario, desde 2 células hasta el día 3 del desarrollo.

Se observa con más facilidad en el estadio de 2 células (Balakier y Cadesky, 1997). A partir del día 3 de desarrollo es más difícil la visualización de los núcleos, debido al tamaño menor de los blastómeros y al número mayor de células (Van Royen y cols., 2003; Parriego y cols., 2013), pero es posible hacerlo mediante movimientos secos de la platina, para que el embrión gire y permita observar tanto la multinucleación como la uninucleación. La presencia de multinucleación es frecuente, pero la incidencia varía mucho en los distintos estudios, existiendo incluso variaciones significativas entre observadores (Paternot y cols., 2009). Numerosos trabajos han mostrado que la observación de la nucleación y en particular de la multinucleación es un parámetro de alto valor predictivo de la viabilidad de un embrión (Jackson y cols., 1998; Pelinck y cols., 1998; Van Royen y cols., 2001, 2003; Meriano y cols., 2004; Cuadros y cols., 2011).

La multinucleación suele ir asociada a otros parámetros de mal pronóstico, como un porcentaje alto de fragmentación y blastómeros con división desigual, así como una tasa menor de formación de blastocistos (Balakier y Cadesky, 1997; Jackson y cols., 1998; Hnida y cols., 2004; Yakin y cols., 2005). Además, según diversos autores, los embriones multinucleados presentan un número mayor de alteraciones cromosómicas (Grifo y cols., 1990; Pickering y cols., 1995; Hardarson y cols., 2001; Munne, 2006;

Agerholm y cols., 2008; Parriego y cols., 2013) y una mayor tasa de abortos (Jackson y cols., 1998; Scott y cols., 2007; Fauque y cols., 2013). Sin embargo, en algunos estudios se muestran casos de implantación y nacidos vivos a partir de embriones multinucleados (Elder y Cohen, 2007; Parriego y cols., 2013).

### **3.13. Valoración morfológica del blastocisto**

Después de la compactación celular, en la que las células pierden su identidad celular, empieza a formarse una cavidad denominada blastocele y se produce la diferenciación celular. Esta nueva disposición recibe el nombre de blastocisto. Las partes principales de evaluación de los blastocistos son dos, masa celular interna y trofoctodermo.

El cultivo y transferencia en estadio de blastocisto arroja tasas de gestación y recién nacido vivo mayores a las observadas en las transferencias de embriones en día 3 de desarrollo (Papanikolaou y cols., 2006; Styer y cols., 2008), por lo que se considera que puede ser una buena herramienta de selección embrionaria, que permite además reducir el número de gestaciones múltiples (Gardner y Schoolcraft, 1999). Los datos publicados en la revisión de Cochrane (Glujovsky y cols., 2012) así lo demuestran, mostrando que las tasas de nacido vivo son mejores que las que se consiguen con embriones en estadios más tempranos, aunque la tasa de embarazo clínico acumulada con la descongelación es significativamente más alta en día 2 y 3 que en día 5 y 6 de desarrollo, probablemente debido a que en estadios tempranos se congela con más frecuencia y hay menos cancelaciones de las transferencias (Glujovsky y cols., 2012). No todos los embriones son capaces de llegar a la fase de blastocisto. Está descrito que sólo entre el 40% y el 60% de los ovocitos fecundados *in vitro* llegan a este estadio (Gardner y cols., 1998; Behr y cols., 1999), y esta capacidad está relacionada directamente con la morfología que presenta el embrión en estadios más tempranos.

En este estudio se siguió la clasificación ASEBIR muy parecida a la de Gardner (Gardner y cols., 1998), donde los parámetros que se tienen en

## Materiales y métodos

cuenta son: el tamaño, forma y grado de compactación de la masa celular interna (MCI), el grado de expansión del blastocele, y la estructura y número de células del trofoectodermo (TE), estipulando cuatro categorías: A, B, C y D. que además concuerda con estudios publicados previamente que adjudican mayor relevancia a la morfología del TE respecto a la MCI (Ahlström y cols., 2011; Hill y cols., 2013).

### **3.13.1. Masa celular interna**

Este es un parámetro importante para definir las distintas categorías de blastocistos, ya que la MCI origina el hipoblasto y el epiblasto, que darán lugar respectivamente a la vesícula vitelina y a los tres linajes celulares, ectodermo, endodermo y mesodermo, además del saco amniótico (Trounson, 2002). La masa celular interna ha de tener una forma ovalada y sus células deben estar compactadas.

El tamaño favorable varía entre 1900 y 3800  $\mu\text{m}^2$ . Tamaños inferiores implicarían un menor potencial implantatorio (Richter y cols., 2001).

Se clasifica por el número de células que se observa. Se diferencian cuatro tipos:

- *Tipo 1*: Ausente o degenerada.
- *Tipo 2*: muy pocas células.
- *Tipo 3*: varias células agrupadas y de aspecto laxo.
- *Tipo 4*: compacta, con muchas células, redonda y bien definida.

Para poder realizar el estudio estadístico se han hecho diferentes grupos:

- *Grupo 1*: valores de 0.5 a 1.5 de masa celular interna.
- *Grupo 2*: valores de 1.5 a 2.5 de masa celular interna.
- *Grupo 3*: valores de 2.5 a 3.5 de masa celular interna.
- *Grupo 4*: valores de 3.5 a 4.5 de masa celular interna.

### 3.13.2. Trofoctodermo

Esta estructura se caracteriza por presentar una monocapa de células cohesionadas que constituyen la pared del blastocelo o cavidad del blastocisto. El número, la forma y el grado de cohesión nos ayudarán a clasificar el blastocisto en las distintas categorías:

A pesar de que la calidad morfológica del TE es fundamental para valorar el embrión, los blastocistos con TE subóptimo presentan buenas tasas de implantación, siempre que la MCI tenga una morfología normal (Kovacic y cols., 2004; Ahlström y cols., 2011; Hill y cols., 2013).

Se clasifica según el número de células que se observan. Se diferencian cuatro tipos:

- *Tipo 1*: con células degeneradas.
- *Tipo 2*: formado por pocas células.
- *Tipo 3*: incompleto, presenta alguna zona lineal.
- *Tipo 4*: completo, formado por muchas células.

Para poder realizar el estudio estadístico se han hecho diferentes grupos:

- *Grupo 1*: valores de 0.5 a 1.5 de trofoctodermo.
- *Grupo 2*: valores de 1.5 a 2.5 de trofoctodermo.
- *Grupo 3*: valores de 2.5 a 3.5 de trofoctodermo.
- *Grupo 4*: valores de 3.5 a 4.5 de trofoctodermo.

### 3.14. Prueba de embarazo

La prueba de embarazo se lleva a cabo 10 días después de la transferencia midiendo los niveles de  $\beta$ -HCG en sangre. La prueba es positiva a partir de un valor de 10 mUI/ml.

### **3.15. Tasa de implantación**

La transferencia en el laboratorio puede ser de uno o dos embriones por lo que la tasa de implantación puede variar en función del número de sacos gestacionales, dándole nosotros unos valores para poder realizar el análisis estadístico.

- 1: 0% de implantación.
- 2: 50% de implantación.
- 3: 100% de implantación.

### **3.16. Seguimiento del embarazo**

Se realiza un seguimiento del embarazo para saber su evolución, valorando los abortos.

- 1: embarazo positivo. Prueba en sangre de la hormona  $\beta$ -HCG con valor mayor a 10.
- 2: embarazo negativo. Prueba en sangre de la hormona  $\beta$ -HCG con valor menor a 10.
- 3: aborto bioquímico. Cuando tras una prueba de  $\beta$ -HCG positiva se negativiza antes de ver el saco vitelino ecográficamente.
- 4: aborto clínico. Aborto tras observar el saco vitelino.
- 5: ectópico. Anidación del embrión fuera del útero.
- 6: no transferencia. Debido a que la calidad embrionaria no llega a unos mínimos para poder transferir.

### **3.17. Tratamiento estadístico y ajuste de datos**

Los datos numéricos de los diferentes experimentos se procesaron utilizando hojas de cálculo Microsoft Excel.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 22.0. (IBM, Chicago, IL, EE.UU.). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (o Shapiro-Wilk si es menor de 50) para comprobar la normalidad de los datos.

Las variables cualitativas se presentaron como frecuencias y porcentajes y las variables cuantitativas se describieron como media  $\pm$  SD.

Para establecer las diferencias entre las actividades enzimáticas en función de los diferentes tipos de simetría y embriones que consiguen embarazo se utilizó el test t-de Student cuando la distribución resultó normal y se comparaban dos grupos y el test ANOVA en caso de más de dos categorías. Cuando la distribución de los datos era no paramétrica se aplicó el test U de Mann Whitney en caso de dos categorías y Krukall- Wallis cuando eran más de dos.

Se realizaron correlaciones de Pearson para examinar las asociaciones entre calidad seminal, tasa de fecundación, calidad embrionaria y actividades enzimáticas. Cuando las variables no presentaron una distribución normal se utilizaron correlaciones de Spearman.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ .



## **IV. Resultados**



## 4.1. Parámetros seminales, tasa de fecundación y parámetros de calidad embrionaria

### 4.1.1. Parámetros de calidad seminal

Para la realización de este trabajo se llevó a cabo el estudio de actividades enzimáticas en las muestras seminales empleadas en ciclos de fecundación *in vitro* de 115 pacientes de la Unidad de Reproducción asistida de la clínica IVI Bilbao.

Al inicio del tratamiento en el laboratorio de fecundación *in vitro* se analizaron las siguientes variables relativas a la calidad seminal: concentración espermática (M/ml); movilidad de los espermatozoides clasificándolos en progresivos, no progresivos e inmóviles (%); morfología espermática normal (%). Las medias, desviaciones típicas (SD) y valores máximos y mínimos de los citados parámetros se representan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Parámetros descriptivos de calidad seminal

	<b>Media</b>	<b>SD (±)</b>	<b>Valor Mínimo</b>	<b>Valor Máximo</b>	<b>Muestras (n)</b>
<b>Concentración (M/ml)</b>	52.15	34.14	2	150	112
<b>Espermatozoides progresivos (%)</b>	53.82	14.74	6	82	115
<b>Espermatozoides no progresivos (%)</b>	9.26	8.14	0	77	115
<b>Espermatozoides inmóviles (%)</b>	35.7	15.54	0	78	115
<b>Morfología espermática normal (%)</b>	2.36	2.20	0	14	89

*SD: desviación típica*

#### 4.1.2. Tasa de fecundación

La tasa de fecundación se analizó 17-20 horas post inseminación o microinyección intracitoplasmática. En la Tabla 6 pueden observarse los valores descriptivos para la tasa de fecundación en la presente muestra, calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de Fecundación} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de ovocitos correctamente fecundados}}{\text{N}^{\circ} \text{ de ovocitos maduros}} \times 100$$

**Tabla 6.** Parámetros descriptivos referentes a la tasa de fecundación

	<b>Media</b>	<b>SD (±)</b>	<b>Valor Mínimo</b>	<b>Valor Máximo</b>	<b>Muestras (n)</b>
<b>Tasa de fecundación (%)</b>	63.84	22.81	0	100	116

*SD: desviación típica*

#### 4.1.3. Parámetros de calidad embrionaria

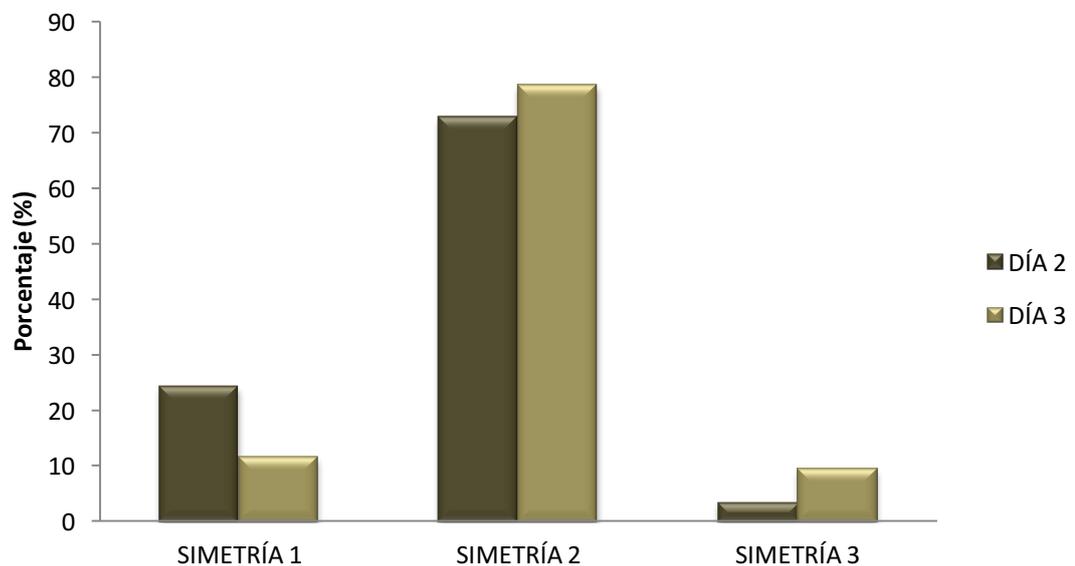
Las variables relativas a la calidad embrionaria, así como sus valores descriptivos pueden observarse en la Tabla 7. Para determinar la calidad embrionaria se cuantificaron en el día 2 y el día 3 de desarrollo embrionario el número de células del embrión, la fragmentación celular y el número de células multinucleadas.

Otro de los indicadores de calidad embrionaria analizados fue la simetría embrionaria. En la Figura 17 se representan la frecuencia en porcentaje, de los tipos de simetría para las muestras analizadas pasados dos y tres días desde la fecundación. En ambos grupos muestrales, la simetría tipo 2 fue la más frecuente. El 72% de las muestras analizadas al 2º día de desarrollo presentaron una simetría tipo 2, el 24% de las mismas tipo 1 y el 3,6% tipo 3. Entre las muestras analizadas al 3º día el 78,6% presentaron una simetría tipo 2, el 11,9% de las mismas tipo 1 y el 9,7 tipo 3.

**Tabla 7.** Parámetros descriptivos relativos a la calidad embrionaria tanto en día 2 como en día 3 de desarrollo embrionario

	Media	SD (±)	Valor Mínimo	Valor Máximo	Muestras (n)
<b>Células D2 (n)</b>	3.75	0.71	1	6	111
<b>Fragmentación D2 (%)</b>	4.83	5.21	0	25	111
<b>Células multinucleadas D2 (n)</b>	0.43	1.08	0	5	53
<b>Células D3 (n)</b>	6.57	1.26	3.5	10	102
<b>Fragmentación D3 (%)</b>	5.44	5.40	0	24	104
<b>Células multinucleadas D3 (n)</b>	0.33	0.87	0	4	49

*SD: desviación típica; D2: día 2 de desarrollo embrionario; D3 día 3 de desarrollo embrionario*



**Figura 17.** Distribución de la muestra en porcentajes según el tipo de simetría embrionaria en día 2 y día 3 de desarrollo

## 4.2. Niveles de actividades peptidásicas en las diferentes fracciones seminales y su relación con indicadores de la calidad seminal

### 4.2.1. Distribución de la actividad enzimática en fracciones seminales

Se estudió la actividad de las enzimas APN, DPP IV, PEP y NEP en las siguientes fracciones de eyaculado: espermatozoides, líquido seminal y prostasomas. Las medias, desviaciones típicas y valores máximos y mínimos de los citados parámetros se representan en las Tablas 8, 9, 10 y 11.

**Tabla 8.** Actividad enzimática APN en fracciones seminales

	Media	SD ( $\pm$ )	Valor Mínimo	Valor Máximo	Muestras (n)
<b>APN espermatozoides</b>	19816,1	17693,0	1349,4	97865,2	70
<b>APN líquido seminal</b>	26429,8	19447,6	2353,9	78816,9	81
<b>APN prostasomas</b>	108699,8	74148,4	1879,3	334660,6	96

APN: Aminopeptidasa N; La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra; SD: desviación típica

**Tabla 9.** Actividad enzimática DPPI IV en fracciones seminales

	Media	SD ( $\pm$ )	Valor Mínimo	Valor Máximo	Muestras (n)
<b>DPP IV espermatozoides</b>	27460,0	30284,8	1826,0	128416,0	34
<b>DPP IV líquido seminal</b>	3075,9	2515,0	358,48	8552,8	34
<b>DPP IV prostasomas</b>	70164,5	64394,4	5889,0	273795,0	36

DPPI IV: Dipeptidil Peptidasa IV; La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra; SD: desviación típica

**Tabla 10.** Actividad enzimática PEP en fracciones seminales

	<b>Media</b>	<b>SD (<math>\pm</math>)</b>	<b>Valor Mínimo</b>	<b>Valor Máximo</b>	<b>Muestras (n)</b>
<b>PEP espermatozoides</b>	464,78	646,45	28,0	3275,0	36
<b>PEP líquido seminal</b>	56,37	45,33	8,00	178,0	41
<b>PEP prostasomas</b>	341,77	381,25	1,19	1544,26	41

*PEP: Prolil Endopeptidasa; La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra; SD: desviación típica*

**Tabla 11.** Actividad enzimática NEP en fracciones seminales

	<b>Media</b>	<b>SD (<math>\pm</math>)</b>	<b>Valor Mínimo</b>	<b>Valor Máximo</b>	<b>Muestras (n)</b>
<b>NEP espermatozoides</b>	9,01	5,35	1,67	25,46	38
<b>NEP líquido seminal</b>	0,76	0,40	0,23	2,24	55
<b>NEP prostasomas</b>	20,98	7,43	10,39	39,85	66

*NEP: Endopeptidasa Neutra; La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra; SD: desviación típica*

#### 4.2.2. Relación entre la actividad enzimática y la edad en las diferentes fracciones seminales

La relación entre la actividad enzimática y la edad de los varones analizada mediante el coeficiente de correlación de Spearman, se muestra en la Tabla 12.

Se halló una correlación negativa estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre la actividad de la enzima APN en la fracción de prostasomas y la edad del hombre, así como una correlación positiva estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre la actividad de la enzima NEP en la fracción de prostasomas y la edad del hombre. (Tabla 12).

**Tabla 12.** Correlaciones entre las actividades enzimáticas APN, DPP IV, PEP y NEP y la edad de los pacientes, en las fracciones seminales

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	$p$	n	R	$p$	n	R	$p$	n
<b>APN</b>	-0.064	0.620	62	-0.140	0.242	72	-0.214	<b>0.050*</b>	82
<b>DPP IV</b>	-0.202	0.275	31	-0.271	0.141	31	-0.270	0.129	33
<b>PEP</b>	-0.145	0.414	34	0.096	0.561	39	-0.047	0.777	39
<b>NEP</b>	0.198	0.233	38	0.228	0.093	55	0.239	<b>0.050*</b>	66

R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

### 4.2.3. Relación entre la actividad enzimática e indicadores de calidad seminal

La relación entre la actividad de las mencionadas enzimas y las variables indicadoras de calidad seminal (concentración espermática, porcentaje de espermatozoides progresivos, no progresivos e inmóviles y morfología espermática normal) fue analizada mediante la prueba de correlación de Spearman para todos los casos a excepción de la correlación entre espermatozoides inmóviles y actividad NEP en prostasomas, en la que se utilizó la prueba de Pearson.

Se hallaron correlaciones negativas estadísticamente significativas entre la actividad de la APN en líquido seminal y la concentración de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides progresivos. La correlación para la actividad de la APN de la mencionada fracción de líquido seminal fue positiva y estadísticamente significativa con el porcentaje de espermatozoides no progresivos, así como con la morfología normal de los mismos. También se halló una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y la actividad de la APN en la fracción de prostasomas (Tabla 13).

**Tabla 13.** Correlaciones entre la actividad enzimática APN y los indicadores de calidad seminal, en las fracciones seminales

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	$p$	n	R	$p$	n	R	$p$	n
<b>Concentración (M/ml)</b>	0.045	0.723	66	-0.245	<b>0.028*</b>	81	-0.130	0.220	90
<b>Progresivos (%)</b>	-0.159	0.197	68	-0.266	<b>0.015*</b>	83	-0.072	0.492	93
<b>No progresivos (%)</b>	0.051	0.680	68	0.230	<b>0.037*</b>	83	-0.034	0.746	93
<b>Inmóviles (%)</b>	0.063	0.607	68	0.179	0.105	83	0.088	0.399	93

R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

## Resultados

En la Tabla 14 se representan las correlaciones de la actividad de la enzima DPP IV con los parámetros seminales analizados. Únicamente se reveló una correlación negativa y significativa entre actividad enzimática de la fracción de prostasomas y la concentración seminal.

**Tabla 14.** Correlaciones entre la actividad enzimática DPP IV y los indicadores de calidad seminal, en las fracciones seminales

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Concentración (M/ml)</b>	-0.207	0.263	31	-0.201	0.278	31	-0.418	<b>0.015*</b>	33
<b>Progresivos (%)</b>	-0.327	0.073	31	-0.199	0.284	31	-0.234	0.189	33
<b>No progresivos (%)</b>	-0.039	0.836	31	-0.136	0.466	31	-0.295	0.095	33
<b>Inmóviles (%)</b>	0.299	0.103	31	0.183	0.324	31	0.322	0.068	33

R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

La actividad de la enzima PEP no mostró correlaciones estadísticamente significativas con los parámetros seminales estudiados. La relación entre la actividad de la mencionada enzima en la fracción de espermatozoides y líquido seminal y la concentración seminal de espermatozoides fue positiva, pero negativa para la correlación con la actividad de prostasomas. Se observó para las tres fracciones (espermatozoides, líquido seminal y prostasomas) una relación negativa, aunque no significativa, entre la actividad de PEP y el porcentaje de espermatozoides progresivos, así como con el de no progresivos y una relación positiva con el porcentaje de inmóviles, así como con el de morfológicamente normales (Tabla 15).

**Tabla 15.** Correlaciones entre la actividad enzimática PEP y los indicadores de calidad seminal, en las fracciones seminales

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Concentración (M/ml)</b>	0.030	0.867	34	0.253	0.121	39	-0.018	0.911	39
<b>Progresivos (%)</b>	-0.036	0.841	34	-0.085	0.607	39	-0.170	0.300	39
<b>No progresivos (%)</b>	-0.255	0.133	36	-0.109	0.499	41	-0.206	0.196	41
<b>Inmóviles (%)</b>	0.074	0.670	36	0.123	0.445	41	0.248	0.118	41
<b>Morfología normal (%)</b>	0.213	0.428	16	0.070	0.768	20	0.110	0.655	19

R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

## Resultados

La actividad de la enzima NEP en la fracción de líquido seminal mostró una correlación negativa y estadísticamente significativa con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Aunque no se hallaron más correlaciones estadísticamente significativas, se observó para las tres fracciones (espermatozoides, líquido seminal y prostasomas) una relación negativa de la actividad de NEP con la concentración seminal y con la cantidad de espermatozoides morfológicamente normales. La correlación entre la actividad enzimática de NEP y el porcentaje de espermatozoides progresivos fue positiva para las fracciones espermatozoides y prostasomas, pero negativa para la actividad de líquido seminal, al contrario de lo observado para la cantidad de espermatozoides no progresivos, así como para la cantidad de inmóviles, aunque ninguna de ellas fue significativa. La correlación entre la actividad enzimática en prostasomas y el porcentaje de inmóviles se ha calculado mediante la correlación de Pearson (Tabla 16).

**Tabla 16.** Correlaciones entre la actividad enzimática NEP y los indicadores de calidad seminal, en las fracciones seminales

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Concentración (M/ml)</b>	-0.024	0.886	38	-0.204	0.135	55	-0.046	0.715	66
<b>Progresivos (%)</b>	0.041	0.807	38	-0.179	0.192	55	0.167	0.180	66
<b>No progresivos (%)</b>	-0.029	0.864	38	0.138	0.315	55	-0.166	0.184	66
<b>Inmóviles (%)</b>	-0.075	0.653	38	0.150	0.274	55	-0.121	0.333	66
<b>Morfología normal (%)</b>	-0.118	0.573	25	-0.325	<b>0.050*</b>	35	-0.005	0.976	39

R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

### 4.3. Actividades peptidásicas seminales y tasa de fecundación

La relación entre la actividad enzimática seminal y la tasa de fecundación se estudió mediante la prueba de correlación de Spearman excepto para la enzima NEP en la fracción de prostasomas, para la que se utilizó la prueba de Pearson. Se halló una correlación negativa estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre la tasa de fecundación y la actividad de NEP de la fracción de espermatozoides.

La correlación entre la actividad enzimática de la enzima NEP en prostasomas y la tasa de fecundación se ha calculado mediante la correlación de Pearson (Tabla 17).

**Tabla 17.** Correlaciones entre las actividades enzimáticas APN, DPP IV, PEP y NEP y la tasa de fecundación, en las fracciones seminales

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	$p$	n	R	$p$	n	R	$p$	n
<b>APN</b>	0.056	0.657	65	-0.099	0.381	81	-0.041	0.702	90
<b>DPP IV</b>	0.213	0.250	31	0.308	0.092	31	-0.138	0.443	33
<b>PEP</b>	0.033	0.853	34	0.035	0.833	38	-0.014	0.933	38
<b>NEP</b>	-0.770	<b>0.000**</b>	38	-0.202	0.139	55	0.077	0.539	66

R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$

### 4.4. Actividades peptidásicas seminales y calidad embrionaria

La relación entre la actividad enzimática y la calidad embrionaria fue estudiada en los días 2 y 3, 5 y 6 tras la fecundación. Como indicadores de calidad embrionaria en día 2 y 3 se utilizaron las siguientes variables: número de células, porcentaje de fragmentación, número de células

## Resultados

multinucleadas y simetría. Como indicadores de calidad embrionaria en día 5 y 6 de desarrollo embrionario, se utilizó el porcentaje de embriones que alcanzan dicho estadio. La relación de la actividad enzimática con las mencionadas variables fue estudiada mediante la prueba de correlación de Pearson o Spearman, excepto en el caso de la simetría, cuya comparación intergrupala fue realizada mediante los test de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis.

### 4.4.1. Actividad enzimática y calidad embrionaria en Día 2 de desarrollo embrionario

Durante el día 2 la actividad de la enzima APN de la fracción de líquido seminal y prostasomas correlacionó negativamente de manera estadísticamente significativa con el número de células del embrión. También se halló una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) pero positiva entre la actividad de la mencionada enzima en las mismas fracciones y el porcentaje de fragmentación. La correlación con el número de células multinucleadas en el embrión fue negativa para la actividad de las fracciones de espermatozoides, así como para prostasomas y positiva para líquido seminal, aunque no estadísticamente significativa (Tabla 18).

**Tabla 18.** Correlaciones entre la actividad enzimática APN en las fracciones seminales y los parámetros de calidad embrionaria en D2

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	$p$	n	R	$p$	n	R	$p$	n
<b>Células D2 (n)</b>	0.032	0.799	65	-0.251	<b>0.025*</b>	80	-0.246	<b>0.020*</b>	89
<b>Fragmentación D2 (%)</b>	-0.023	0.858	64	0.324	<b>0.003*</b>	80	0.224	<b>0.035*</b>	89
<b>Multinucleación D2 (n)</b>	-0.022	0.918	24	0.002	0.994	24	-0.141	0.482	27

D2: Día 2 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

No se hallaron correlaciones estadísticamente significativas para las enzimas DPP IV, PEP y NEP con los parámetros embrionarios del día 2, aunque sí se observó tendencia a la disminución del número de células con mayor actividad de NEP en la fracción de líquido seminal (Tablas 19, 20 y 21).

**Tabla 19.** Correlaciones entre la actividad enzimática DPP IV en las fracciones seminales y los parámetros de calidad embrionaria en D2

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Células D2 (n)</b>	-0.117	0.538	30	-0.130	0.492	30	0.107	0.559	32
<b>Fragmentación D2 (%)</b>	0.021	0.914	29	0.033	0.867	29	-0.059	0.754	31
<b>Multinucleación D2 (n)</b>	0.032	0.871	29	0.086	0.656	29	0.237	0.198	31

D2: Día 2 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

**Tabla 20.** Correlaciones entre la actividad enzimática PEP en las fracciones seminales y los parámetros de calidad embrionaria en D2

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Células D2 (n)</b>	0.052	0.769	34	0.198	0.228	39	0.078	0.637	39
<b>Fragmentación D2 (%)</b>	0.058	0.747	34	0.076	0.647	39	-0.163	0.321	39
<b>Multinucleación D2 (n)</b>	-0.241	0.199	30	-0.086	0.635	33	-0.056	0.759	32

D2: Día 2 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

## Resultados

**Tabla 21.** Correlaciones entre la actividad enzimática NEP en las fracciones seminales y los parámetros de calidad embrionaria en D2

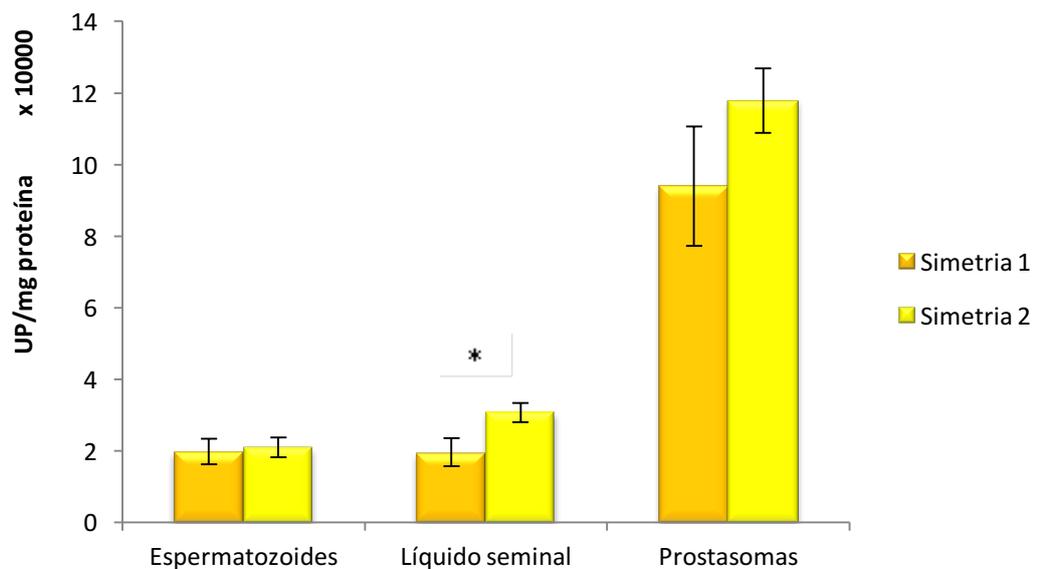
	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Células D2 (n)</b>	0.186	0.272	37	-0.258	0.062	53	0.033	0.795	63
<b>Fragmentación D2 (%)</b>	-0.019	0.913	37	-0.084	0.551	53	-0.228	0.072	63
<b>Multinucleación D2 (n)</b>	ND			ND			0.225	0.532	10

*D2: Día 2 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; ND: no hay datos disponibles; Significación estadística: \*  $p < 0,05$*

A continuación, se muestra la comparación de la actividad de la APN en diferentes grados de simetría de las blastómeras como indicador de la calidad embrionaria. Durante el día 2 se utilizó la prueba Mann-Whitney comparando dos grupos de simetría (simetría tipo 1 y tipo 2).

Durante el 2º día la actividad enzimática de APN en las tres fracciones analizadas (espermatozoides, líquido seminal y prostasomas) fue mayor para los sémenes que dieron lugar a embriones con simetría tipo 2, siendo la diferencia intergrupar estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para la fracción de líquido seminal (Figura 18).

#### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA APN EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SIMETRÍA EMBRIONARIO D2



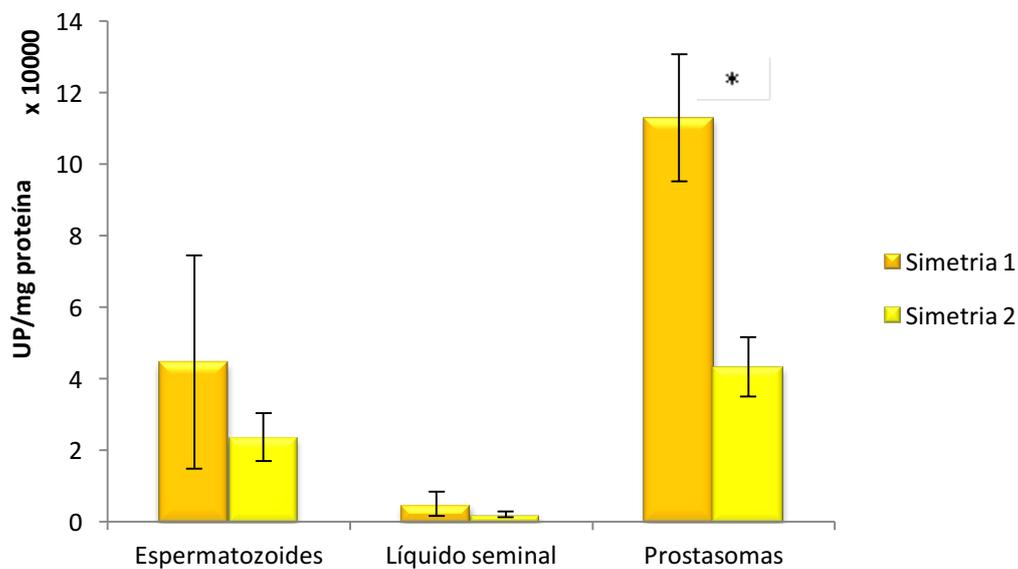
**Figura 18.** Actividad enzimática de la enzima APN en las diferentes fracciones y en embriones según el grado de simetría celular en día 2 de desarrollo embrionario.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

## Resultados

La actividad seminal de la enzima DPP IV fue mayor en aquellos que obtuvieron células con simetría tipo 1 en día 2, siendo la diferencia intergrupal estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en la actividad de la fracción de prostasomas (Figura 19).

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DPP IV EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SIMETRÍA EMBRIONARIO D2

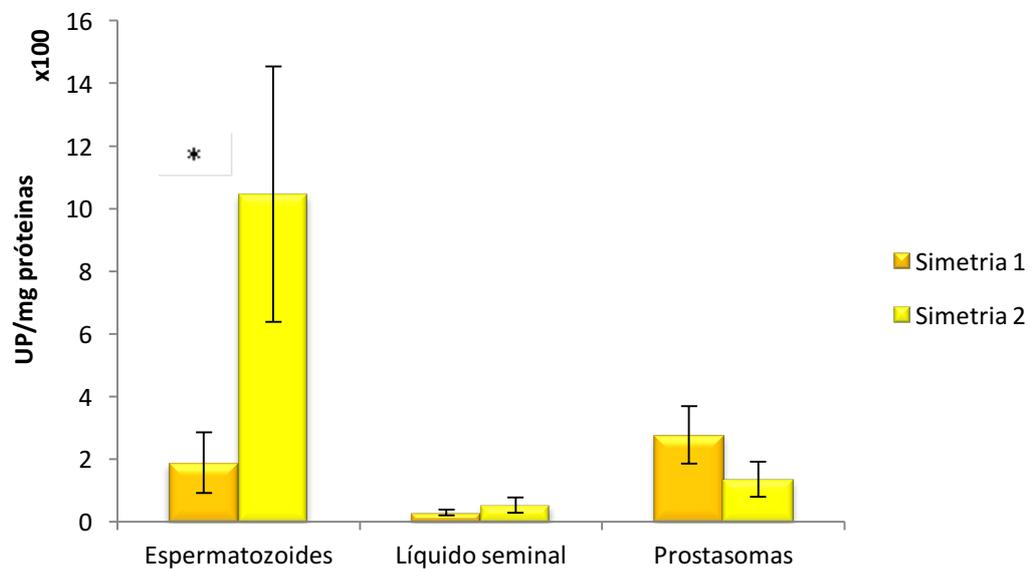


**Figura 19.** Actividad enzimática de la enzima DPP IV en las diferentes fracciones y en embriones según el grado de simetría celular en el día 2 de desarrollo embrionario.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

La actividad enzimática de PEP en las fracciones de espermatozoides y líquido seminal fue mayor para los sémenes que dieron lugar a embriones con simetría tipo 2 en el día 2, siendo la diferencia intergrupal estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en la primera de las mencionadas fracciones (Figura 20).

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SIMETRÍA EMBRIONARIO D2



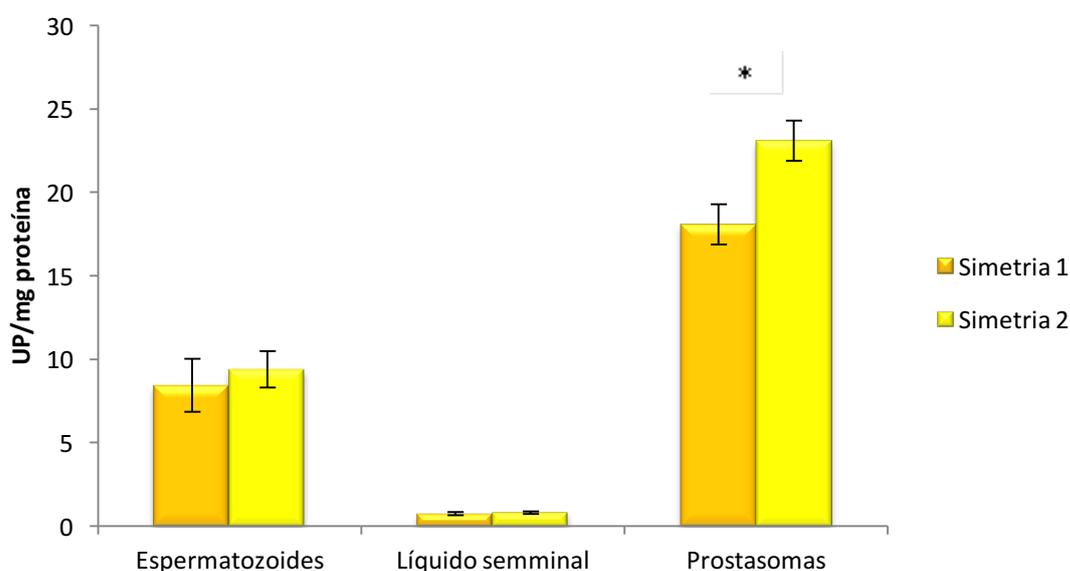
**Figura 20.** Actividad enzimática de la enzima PEP en las diferentes fracciones y en embriones según el grado de simetría celular en el día 2 de desarrollo embrionario.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

## Resultados

La actividad enzimática de NEP en las fracciones de espermatozoides y prostasomas fue mayor para las células con simetría tipo 2 en día 2, siendo la diferencia intergrupar en la segunda estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 21).

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA NEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SIMETRÍA EMBRIONARIO D2



**Figura 21.** Actividad enzimática de la enzima PEP en las diferentes fracciones y en embriones según el grado de simetría celular en día 2 de desarrollo embrionario.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

#### 4.4.2. Actividad enzimática y calidad embrionaria en Día 3 de desarrollo embrionario

En lo que se refiere a los embriones de 3 días, la actividad de la enzima APN en el líquido seminal se correlacionó de manera positiva y estadísticamente significativa con el porcentaje de fragmentación celular. Aunque no fueron estadísticamente significativas, las correlaciones entre la actividad enzimática de APN en todas las fracciones y el número de células de sus embriones correspondientes fueron negativas. La actividad en espermatozoides y en prostasomas mostraron una relación positiva con el porcentaje de fragmentación y el número de células multinucleadas de sus embriones (Tabla 22).

**Tabla 22.** Correlaciones entre la actividad enzimática APN en las fracciones seminales y los parámetros de calidad embrionaria en D3

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Células D3 (n)</b>	-0.052	0.704	55	-0.186	0.117	72	-0.157	0.164	80
<b>Fragmentación D3 (%)</b>	0.087	0.514	58	0.340	<b>0.003*</b>	74	0.188	0.091	82
<b>Multinucleación D3 (n)</b>	0.209	0.351	22	0.046	0.836	23	0.192	0.359	25

D3: Día 3 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

Tal como se puede observar en las siguientes Tablas (23 y 24), las actividades de la DPP IV y de la PEP mostraron una correlación positiva y estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con el del nº de células multinucleadas en día 3 de desarrollo embrionario. La actividad de la enzima NEP mostró una correlación negativa y estadísticamente significativa con el porcentaje de fragmentación celular (Tabla 25). La correlación de la Tabla 25 entre el número de células en día 3 de desarrollo y los prostasomas se ha calculado mediante la correlación de Pearson.

## Resultados

**Tabla 23.** Correlaciones entre la actividad enzimática DPP IV en las fracciones seminales y los parámetros de calidad embrionaria en D3

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Células D3 (n)</b>	-0.413	<b>0.036*</b>	26	-0.247	0.224	26	0.044	0.826	28
<b>Fragmentación D3 (%)</b>	0.006	0.976	26	0.010	0.960	26	0.004	0.984	28
<b>Multinucleación D3 (n)</b>	0.360	0.071	26	0.479	<b>0.013*</b>	26	0.323	0.093	28

D3: Día 3 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

**Tabla 24.** Correlaciones entre la actividad enzimática PEP en las fracciones seminales y los parámetros de calidad embrionaria en D3

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Células D3 (n)</b>	-0.216	0.242	32	-0.067	0.700	36	-0.119	0.490	36
<b>Fragmentación D3 (%)</b>	0.176	0.343	31	0.133	0.439	36	-0.157	0.360	36
<b>Multinucleación D3 (n)</b>	0.250	0.209	27	0.471	<b>0.009*</b>	30	0.285	0.134	29

D3: Día 3 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

**Tabla 25.** Correlaciones entre la actividad enzimática NEP en las fracciones seminales y los parámetros de calidad embrionaria en D3

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Células D3 (n)</b>	-0.246	0.138	33	-0.057	0.693	50	0.128	0.335	59
<b>Fragmentación D3 (%)</b>	-0.176	0.319	34	-0.127	0.375	51	-0.396	<b>0.002*</b>	60
<b>Multinucleación D3 (n)</b>	ND			ND			0.209	0.620	8

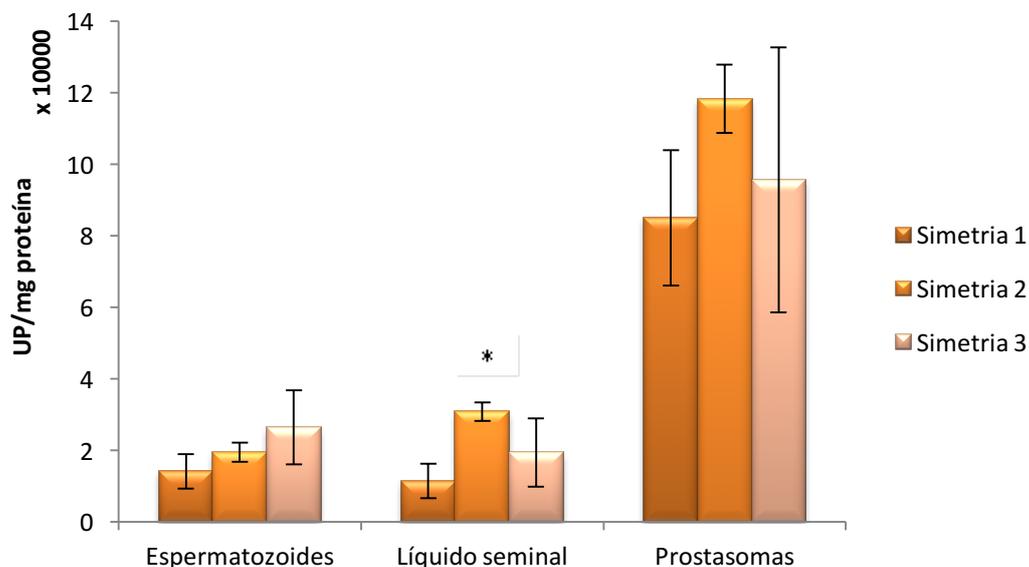
*D3: Día 3 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; ND: Datos no disponibles; Significación estadística: \*  $p < 0,05$*

## Resultados

Al estudiar las diferencias de las peptidasas seminales en blastómeros de embriones en día 3 de desarrollo con diferente grado de simetría, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para comparar tres grupos de simetrías (simetría tipo 1, tipo 2 y tipo 3) excepto para la enzima NEP, para la que se utilizó la prueba Mann-Whitney.

Para la enzima APN, en se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) intergrupales en la fracción de líquido seminal, siendo mayor la actividad en muestras seminales que dan lugar en el día 3 a blastómeros con simetría tipo 2. Se produce la misma tendencia en la actividad de prostasomas, pero sin llegar a tener diferencias significativas (Figura 22).

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA APN EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SIMETRÍA EMBRIONARIO D3

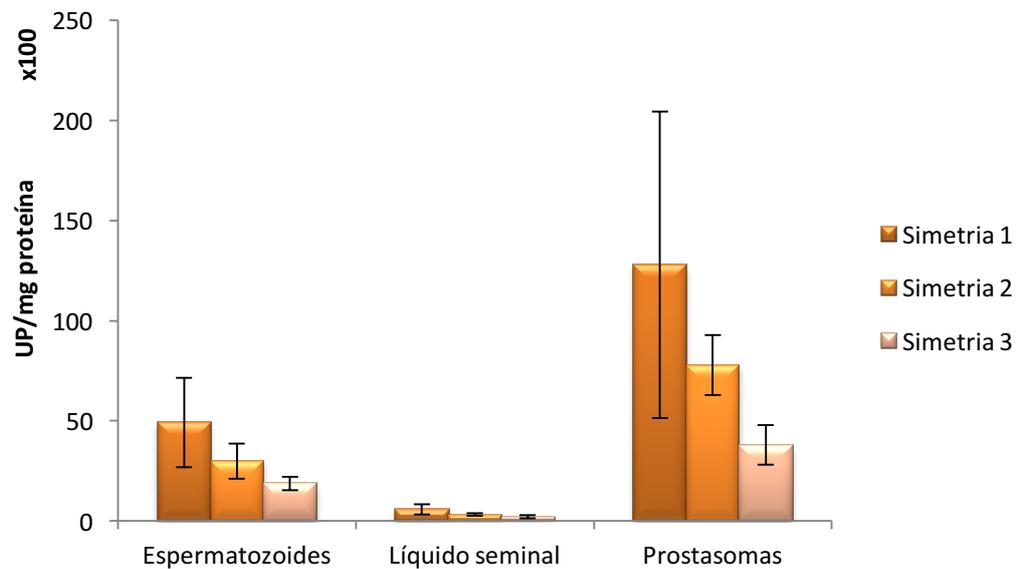


**Figura 22.** Actividad enzimática de la enzima APN en las diferentes fracciones y en embriones según el grado de simetría celular en día 3 de desarrollo embrionario.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

La actividad de la enzima DPP IV en las tres fracciones fue mayor en aquellas muestras que producen embriones con células de simetría tipo 1 en el día 3, aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (Figura 23).

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DPP IV EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SIMETRÍA EMBRIONARIO D3



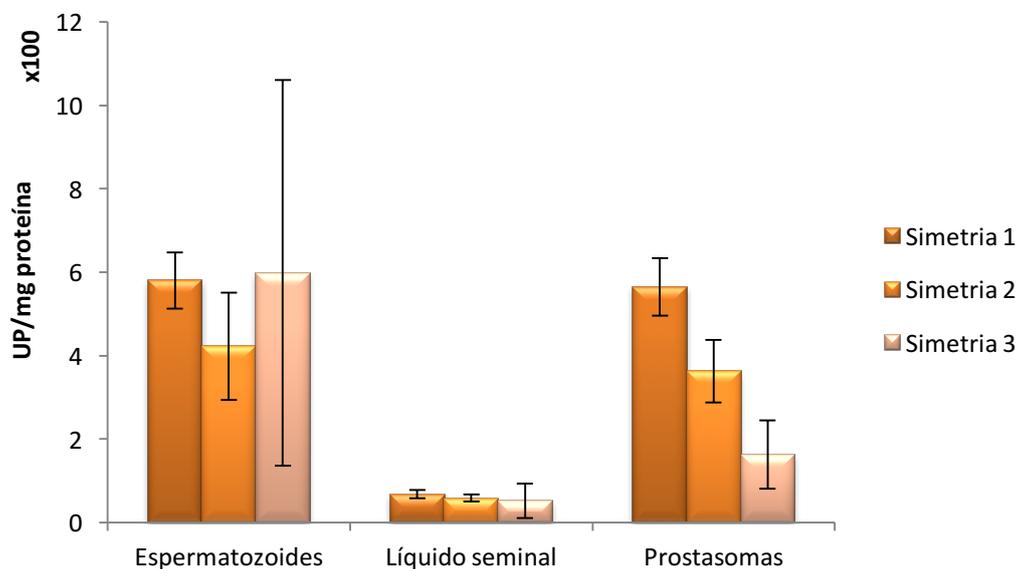
**Figura 23.** Actividad enzimática de la enzima DPP IV en las diferentes fracciones y en embriones según el grado de simetría celular en día 3 de desarrollo embrionario.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

## Resultados

Para la enzima PEP en la fracción de espermatozoides las muestras que producen blastómeras con simetría tipo 3 mostraron mayor actividad respecto a las que producen de tipo 1 y tipo 2 respectivamente. En la fracción de líquido seminal, así como en la de prostasomas las que más actividad mostraron fueron las muestras que produjeron blastómeras con simetría de tipo 1, seguidas de las de tipo 2 y tipo 3 (Figura 24).

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SIMETRÍA EMBRIONARIO D3

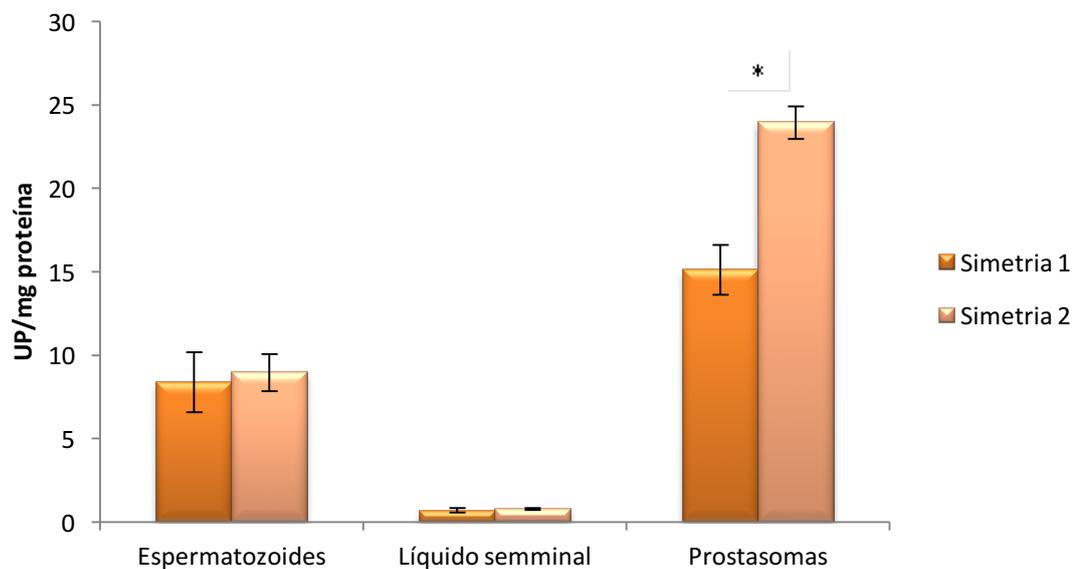


**Figura 24.** Actividad enzimática de la enzima PEP en las diferentes fracciones y en embriones según el grado de simetría celular en día 3 de desarrollo embrionario.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

En la enzima NEP, para las tres fracciones analizadas la actividad fue mayor en aquellas muestras que produjeron embriones con simetría tipo 2 en día 3 de desarrollo siendo la diferencia en prostasomas estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 25).

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA NEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SIMETRÍA EMBRIONARIO D3**



**Figura 25.** Actividad enzimática de la enzima NEP en las diferentes fracciones y en embriones según el grado de simetría celular en día 3 de desarrollo embrionario.

*La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$*

#### 4.4.3. Actividad enzimática y calidad embrionaria en Día 5 de desarrollo embrionario

Para los embriones en día 5 de desarrollo no se hallaron correlaciones estadísticamente significativas entre actividad enzimática y número de células. La correlación entre la actividad enzimática de APN, DPP IV y PEP y el número de células en la fracción de espermetazoides, así como de prostasomas fueron negativas, mientras que para la fracción de líquido seminal fue positiva (Tablas 26, 27 y 28). De la actividad enzimática de NEP no se obtuvieron datos para las fracciones de espermatozoides y líquido seminal, observándose correlación positiva, aunque no estadísticamente significativa con la fracción de prostasomas (Tabla 29).

**Tabla 26.** Correlaciones entre la actividad enzimática APN en las fracciones seminales y el porcentaje de embriones que llegan a desarrollarse en D5

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	p	n	R	p	n	R	p	n
<b>Embriones D5 (%)</b>	-0.220	0.350	20	0.031	0.895	21	-0.167	0.457	22

D5: Día 5 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

**Tabla 27.** Correlaciones entre la actividad enzimática DPP IV en las fracciones seminales y el porcentaje de embriones que llegan a desarrollarse en D5

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	p	n	R	p	n	R	p	n
<b>Embriones D5 (%)</b>	-0.270	0.237	21	0.060	0.792	22	-0.153	0.486	23

D5: Día 5 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

**Tabla 28.** Correlaciones entre la actividad enzimática PEP en las fracciones seminales y el porcentaje de embriones que llegan a desarrollarse en D5

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Embriones D5 (%)</b>	-0.031	0.887	24	0.004	0.984	27	-0.031	0.881	26

D5: Día 5 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

**Tabla 29.** Correlaciones entre la actividad enzimática NEP en las fracciones seminales y el porcentaje de embriones que llegan a desarrollarse en D5

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Embriones D5 (%)</b>	ND			ND			0.331	0.423	8

D5: Día 5 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; ND: Datos no disponibles; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

#### 4.4.4. Actividad enzimática y calidad embrionaria en Día 6 de desarrollo embrionario

Para los embriones en día 6 de desarrollo no se hallaron correlaciones estadísticamente significativas entre actividad enzimática y calidad embrionaria. La correlación entre la actividad enzimática de APN y el número de células en la fracción de espermatozoides, así como de prostasomas fueron negativas, mientras que para la fracción de líquido seminal fue positiva (Tabla 30). La correlación entre la actividad enzimática de DPP IV y el número de células fue negativa en la fracción de espermatozoides y positiva en líquido seminal y prostasomas (Tabla 31). Para la actividad enzimática de PEP se observó una correlación positiva con la fracción de líquido seminal, así como de prostasomas y una correlación negativa con la fracción de espermatozoides (Tabla 32). De la actividad enzimática de NEP no se obtuvieron datos para las fracciones de espermatozoides y líquido seminal, observándose correlación estadísticamente no significativa y positiva con la fracción de prostasomas (Tabla 33).

**Tabla 30.** Correlaciones entre la actividad enzimática APN en las fracciones seminales y porcentaje de embriones que llegan a desarrollarse en D6

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Embriones D6 (%)</b>	-0.220	0.350	20	0.031	0.895	21	-0.167	0.457	22

D6: Día 6 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

**Tabla 31.** Correlaciones entre la actividad enzimática DPP IV en las fracciones seminales y porcentaje de embriones que llegan a desarrollarse en D6

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Embriones D6 (%)</b>	-0.028	0.921	15	0.190	0.481	16	0.037	0.888	17

D6: Día 6 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

**Tabla 32.** Correlaciones entre la actividad enzimática PEP en las fracciones seminales y porcentaje de embriones que llegan a desarrollarse en D6

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Embriones D6 (%)</b>	0.093	0.763	13	0.080	0.777	15	-0.127	0.652	15

D6: Día 6 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

**Tabla 33.** Correlaciones entre la actividad enzimática NEP en las fracciones seminales y porcentaje de embriones que llegan a desarrollarse en D6

	Espermatozoides			Líquido Seminal			Prostasomas		
	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n	R	<i>p</i>	n
<b>Embriones D6 (%)</b>	ND			ND			0.327	0.429	8

D6: Día 6 de desarrollo embrionario; R: Coeficiente de correlación; ND: Datos no disponibles; Significación estadística: \*  $p < 0,05$

## **4.5. Actividades peptidásicas seminales e implantación embrionaria**

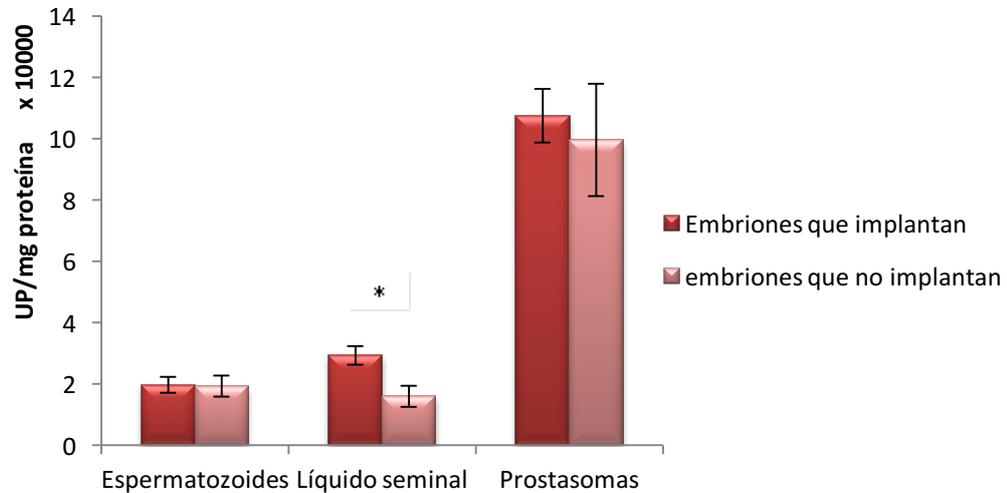
A continuación, se exponen los resultados del análisis de la relación entre la actividad enzimática y la implantación de los embriones.

### **4.5.1. Implantación**

En esta sección se detallan los resultados del análisis de la relación entre la actividad enzimática seminal y la implantación embrionaria tras la transferencia (embriones que implantaron y embriones que no implantaron) llevados a cabo con el test Mann-Whitney.

El ensayo enzimático realizado en prostasomas y en líquido seminal mostró mayor actividad de APN en muestras que produjeron embriones que implantaron respecto a los que no lo hicieron, siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en la fracción de líquido seminal (Figura 26). No se hallaron diferencias intergrupales estadísticamente significativas en las enzimas DPPI IV (Figura 27), PEP (Figura 28) y NEP (Figura 29).

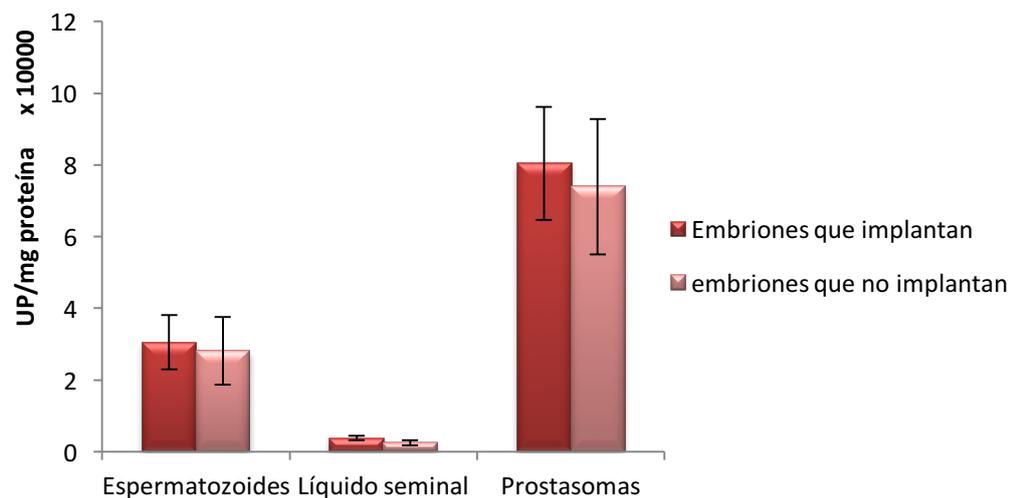
### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA APN EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA



**Figura 26.** Niveles de actividad APN en fracciones seminales correspondientes a embriones que implantan y no implantan.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

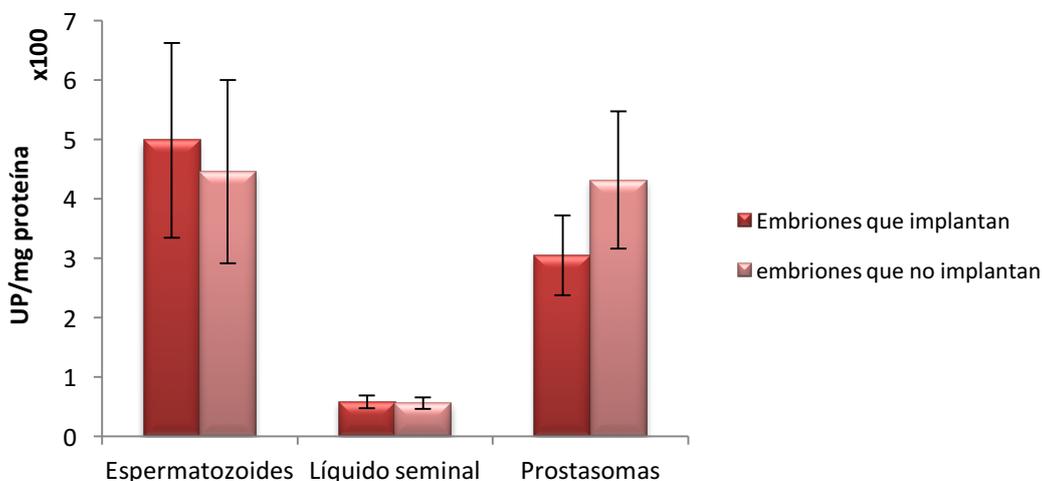
### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DPP IV EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA



**Figura 27.** Niveles de actividad DPP IV en fracciones seminales correspondientes a embriones que implantan y no implantan.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

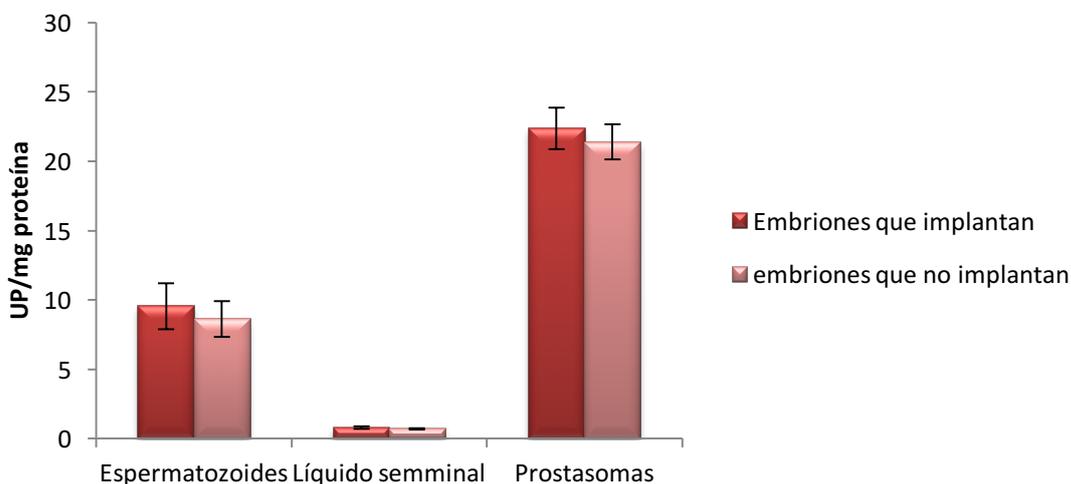
**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**



**Figura 28.** Niveles de actividad PEP en fracciones seminales correspondientes a embriones que implantan y no implantan.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA NEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**



**Figura 29.** Niveles de actividad NEP en fracciones seminales correspondientes a embriones que implantan y no implantan.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

#### 4.5.2. Porcentaje de implantación por transferencia

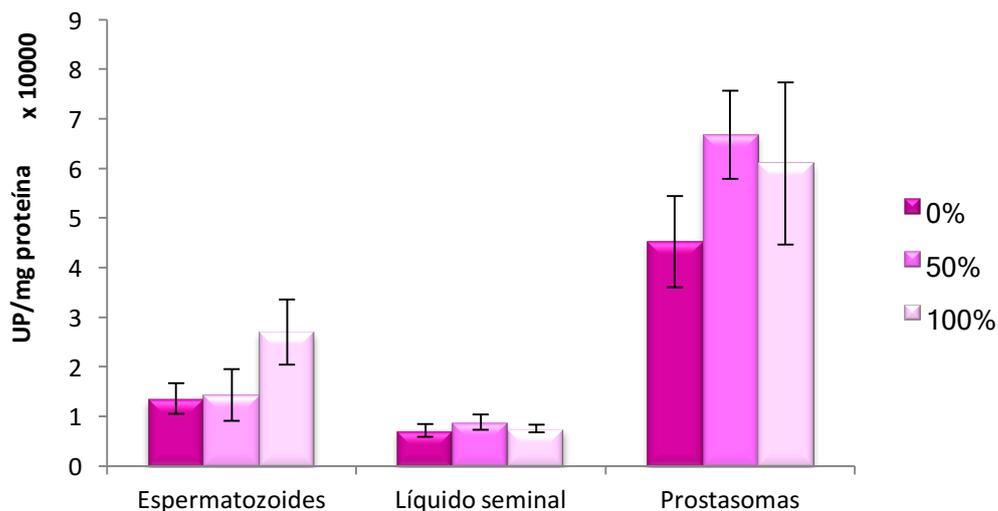
En esta sección se detallan los resultados del análisis de la relación entre la actividad enzimática seminal y el porcentaje de implantación embrionaria tras la transferencia analizados mediante *kruskal-Wallis*: 0% cuando no implanta ningún embrión de los dos embriones transferidos, 50% cuando implanta uno de los dos embriones transferidos y 100% cuando implantan los dos embriones transferidos.

El análisis de la enzima de APN en la fracción de espermatozoides reveló mayor actividad en los espermatozoides correspondientes al grupo de transferencias que consiguieron un 100% de implantación respecto a los grupos que consiguieron el 50 y el 0%. En la fracción de líquido seminal el nivel de actividad enzimática fue muy semejante entre los tres grupos. En la fracción de prostasomas el predominio de actividad enzimática lo obtuvieron los sémenes correspondientes a las transferencias que consiguieron el 50 y el 100% de implantación (Figura 30). La enzima DPP IV en la fracción de espermatozoides mostró mayor actividad en la fracción de espermatozoides del grupo con una implantación del 100%. La actividad en el líquido seminal fue muy semejante para los que consiguieron el 50 y el 100% de implantación y levemente inferior para el grupo que no consiguió implantación. El análisis en prostasomas reveló una actividad semejante para los tres grupos de implantación, siendo el grupo que consiguió el 50% el que tuvo mayor actividad, seguido del grupo que consiguió el 100% de la implantación (Figura 31). El ensayo enzimático para PEP mostró mayor actividad en espermatozoides correspondientes al grupo de transferencias que consiguió una implantación del 100% y menos de la mitad de actividad para el grupo del 50%. La actividad de ésta enzima fue levemente mayor en líquidos seminales correspondientes al grupo de transferencias que consiguieron el 100% de implantación. En la fracción de prostasomas, el grupo con mayor actividad fue el que no consiguió implantación (Figura 32). No se hallaron diferencias intergrupales estadísticamente significativas en el análisis de la actividad de las enzimas APN, DPP IV y PEP. La actividad de la enzima NEP en las tres fracciones fue mayor para el grupo de transferencias que consiguieron una implantación del 100%, seguido de las que no consiguieron implantación y de las que

## Resultados

consiguieron un 50%. Las diferencias intergrupales en la fracción de prostasomas fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (Figura 33).

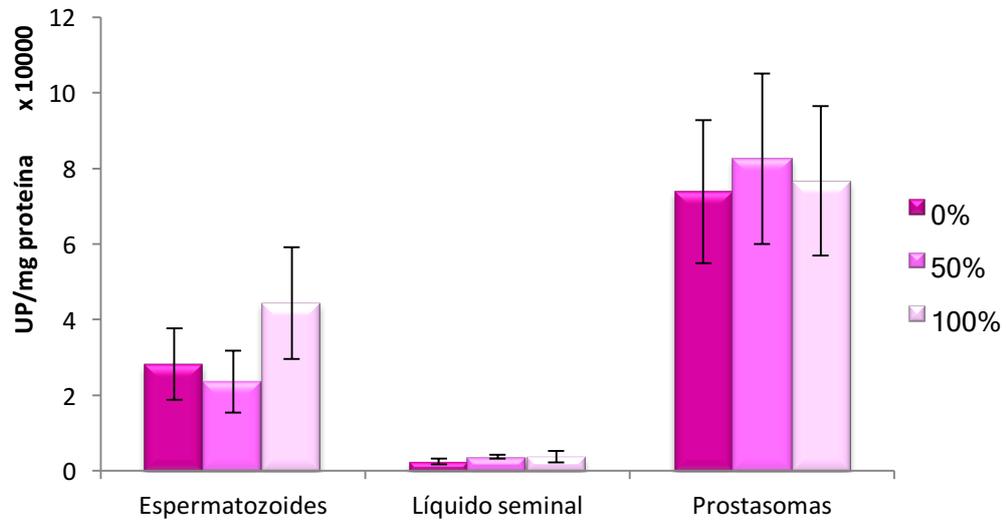
### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA APN EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL % DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA



**Figura 30.** Niveles de actividad de la enzima APN en fracciones seminales dependiendo del % de implantación de los embriones.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

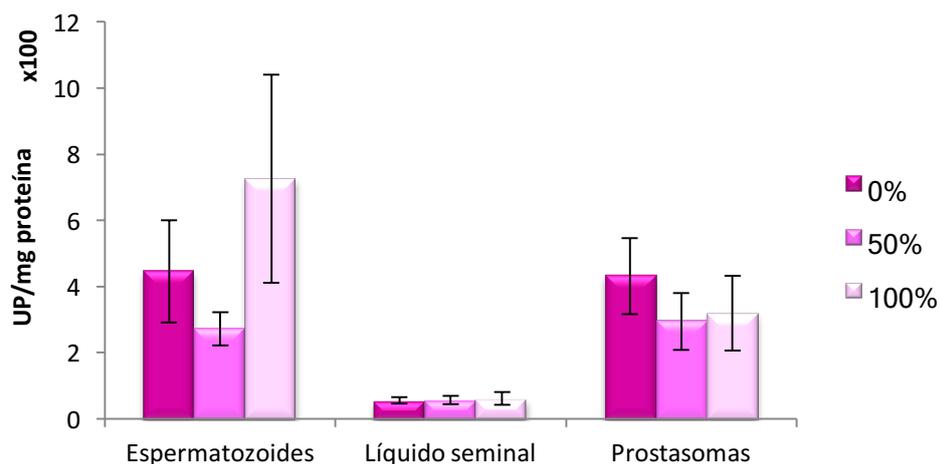
**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DPP IV EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL % DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**



**Figura 31.** Niveles de actividad de la enzima DPP IV en fracciones seminales dependiendo del % de implantación de los embriones.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

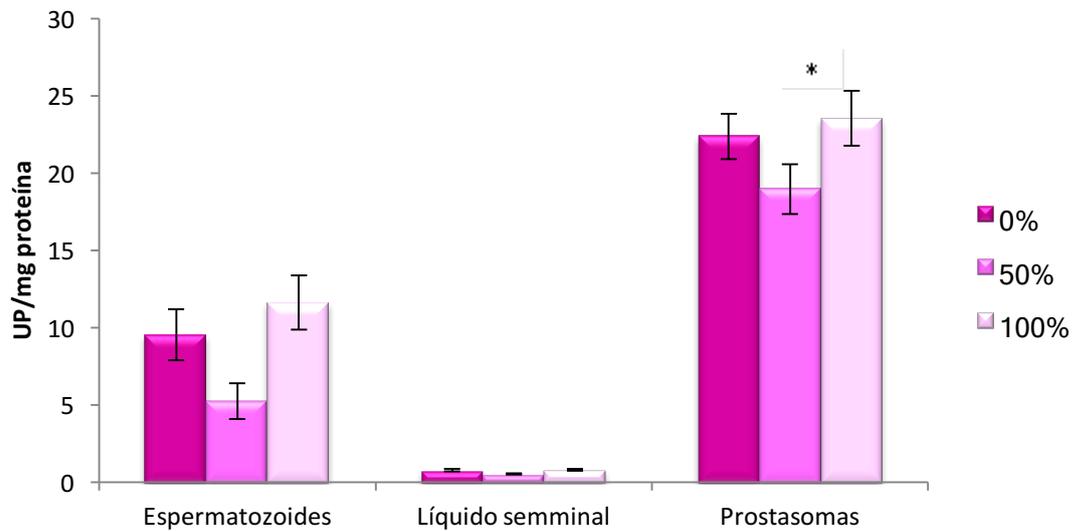
**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL % DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**



**Figura 32.** Niveles de actividad de la enzima PEP en fracciones seminales dependiendo del % de implantación de los embriones.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA NEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL % DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA



**Figura 33.** Niveles de actividad de la enzima NEP en fracciones seminales dependiendo del % de implantación de los embriones.

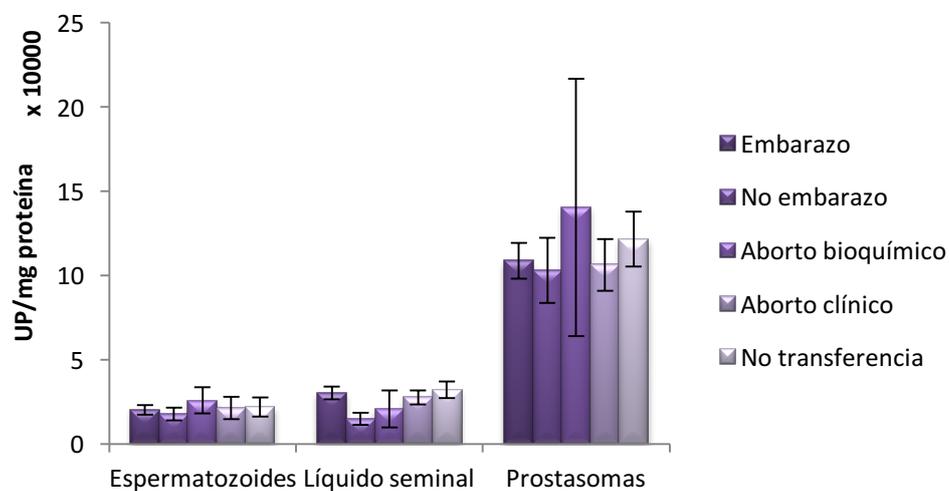
La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

#### **4.6. Actividades peptidásicas seminales y evolución en la gestación**

A continuación, se exponen los resultados del análisis de la relación entre la actividad enzimática seminal y la evolución del embarazo cuando se realizó la transferencia embrionaria (embarazo, no embarazo, aborto bioquímico, aborto clínico y no posibilidad de transferencia) mediante el test Kruskal-Wallis.

Para la enzima APN en la fracción de espermatozoides, se hallaron niveles de actividad similares en todos los casos con predominio para los casos que finalmente resultaron en abortos bioquímicos. El análisis de la mencionada enzima en líquido seminal reveló el doble de actividad para los casos en los que posteriormente no fue posible realizar la transferencia, seguido de los casos de embarazo respecto a los casos en los que no hubo embarazo. En la fracción de prostasomas la actividad de APN predominó en el caso de los abortos bioquímicos. Ninguna de las mencionadas diferencias fue estadísticamente significativa (Figura 34).

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA APN EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA GESTACIÓN**

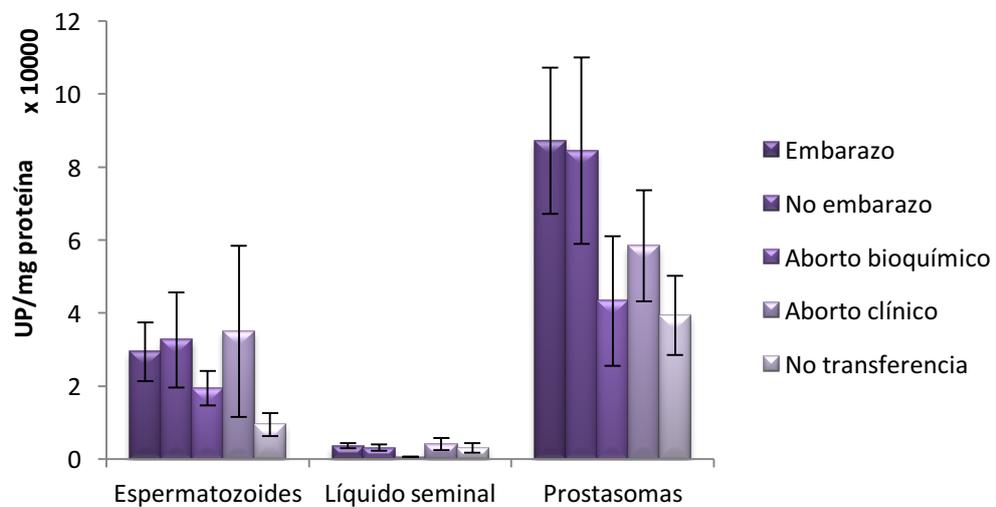


**Figura 34.** Niveles de actividad de la enzima APN en fracciones seminales y evolución de la gestación.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

La actividad de la enzima DPP IV en la fracción de espermatozoides obtuvo mayores niveles de actividad en el grupo de muestras que derivaron en abortos clínicos, seguido de los no embarazos y embarazos. Los niveles de actividad más bajos se obtuvieron en los grupos de aborto bioquímico y de imposibilidad de transferencia. En la fracción de líquido seminal, la actividad de DPP IV fue similar en todos los casos excepto en los que derivaron en aborto bioquímico, con una actividad 6 veces inferior a la de los embarazos. La mayor actividad en prostasomas se halló en los casos que derivaron en aborto bioquímico seguido de los de imposibilidad de transferencia. Ninguna de las mencionadas diferencias fue estadísticamente significativa (Figura 35).

#### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DPP IV EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA GESTACIÓN



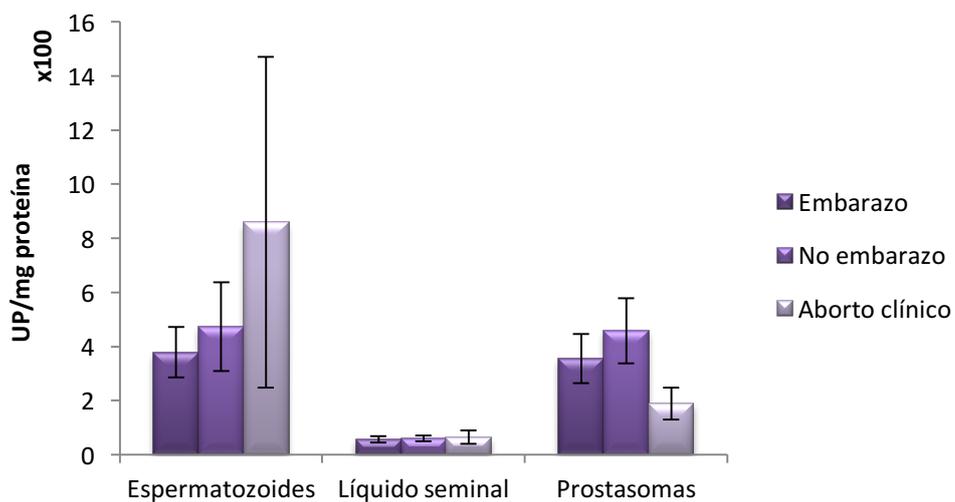
**Figura 35.** Niveles de actividad de la enzima DPP IV en fracciones seminales y evolución de la gestación.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

## Resultados

La enzima PEP en la fracción de espermatozoides mostró su mayor nivel de actividad para los casos que derivaron en aborto clínico, siendo superior al doble de la hallados en los casos de embarazo. En el líquido seminal, los niveles de actividad enzimática fueron muy similares para todos los casos. En la fracción de prostasomas se halló mayor actividad de PEP para el grupo de no embarazo, seguido de los casos de embarazo y de los de aborto clínico. Ninguna de las mencionadas diferencias fue estadísticamente significativa (Figura 36).

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA GESTACIÓN

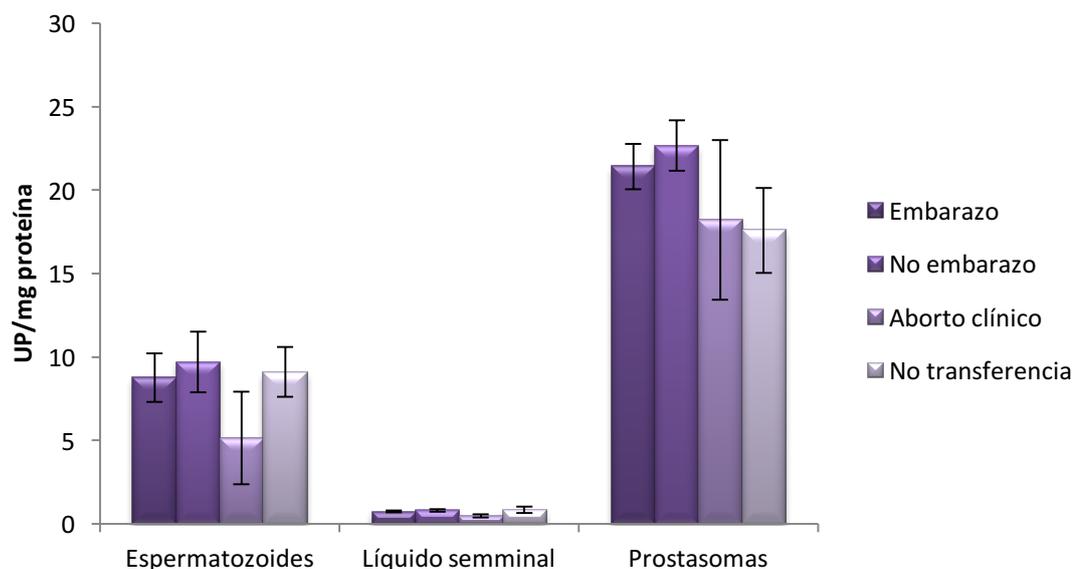


**Figura 36.** Niveles de actividad de la enzima PEP en fracciones seminales y evolución de la gestación.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

La actividad de la enzima NEP en la fracción de espermatozoides fue mayor en las muestras seminales del grupo de no embarazo, no transferencia y embarazo. El grupo de muestras que derivó en de aborto clínico presentaron la menor actividad en ésta fracción. En el análisis de líquido seminal, se hallaron niveles similares de actividad para todos los casos. En la fracción de prostasomas se hallaron los mayores niveles de actividad en las muestras de grupos de no embarazo y de embarazo. La menor actividad de NEP se halló en los casos que derivaron en aborto clínico o en los que no se realizó la transferencia. Ninguna de las mencionadas diferencias fue estadísticamente significativa (Figura 37).

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA NEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA GESTACIÓN



**Figura 37.** Niveles de actividad de la enzima NEP en fracciones seminales y evolución de la gestación.

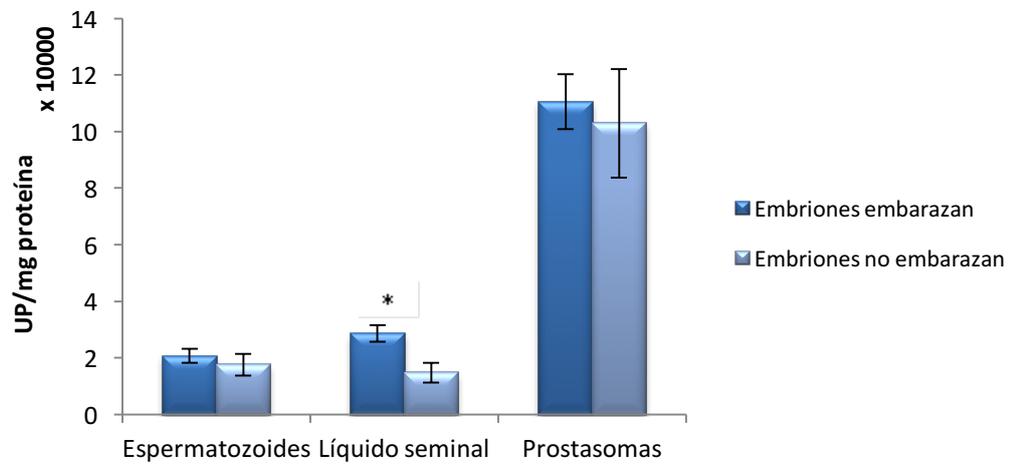
La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

## Resultados

Otra relación estudiada dentro de la evolución del embarazo es la de la actividad enzimática en cada una de las fracciones seminales correspondientes a grupos de embriones que han conseguido embarazo (aunque posteriormente sean un aborto) y los que no han conseguido embarazo. Este análisis se realizó mediante el test Mann-Whitney.

La actividad de la enzima APN en las tres fracciones estudiadas fue mayor en las muestras seminales correspondiente a embriones que dieron lugar a embarazo frente a los que no dieron lugar (Figura 38). El análisis de DPP IV reveló niveles de actividad mayor para las muestras seminales correspondientes al grupo de embriones que no dieron lugar a embarazo (Figura 39). La enzima PEP tuvo una actividad levemente superior en la fracción de espermatozoides correspondientes al grupo de embriones que dio lugar a embarazo, tendencia que se invirtió en el líquido seminal y especialmente en la fracción de prostasomas (Figura 40). La actividad de NEP fue semejante para ambos grupos en las tres fracciones, aunque hubo mayor actividad en todos los casos para las muestras seminales correspondientes al grupo de embriones que no consiguieron embarazo o que no dieron lugar a transferencia (Figura 41). No se hallaron diferencias intergrupales estadísticamente significativas.

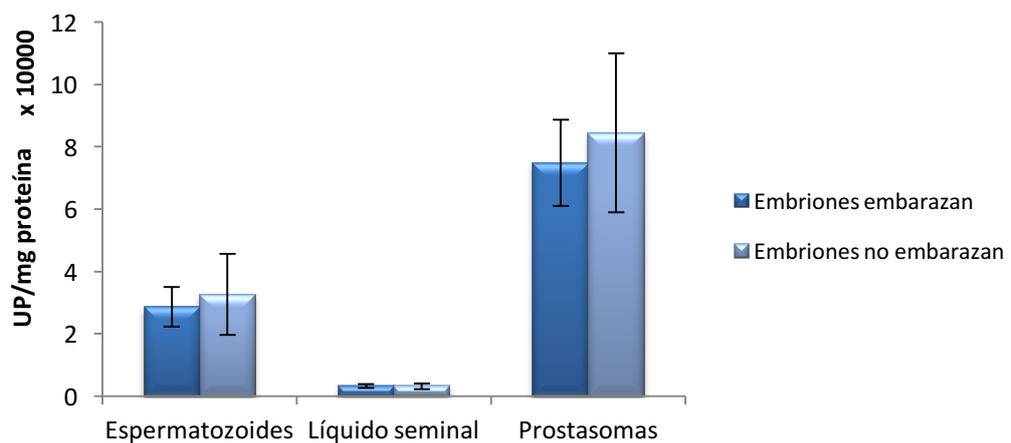
**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA APN EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE SI SE CONSIGUE EMBARAZO O NO**



**Figura 38.** Niveles de actividad de la enzima APN en fracciones seminales correspondientes a embriones que embarazan y no embarazan.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

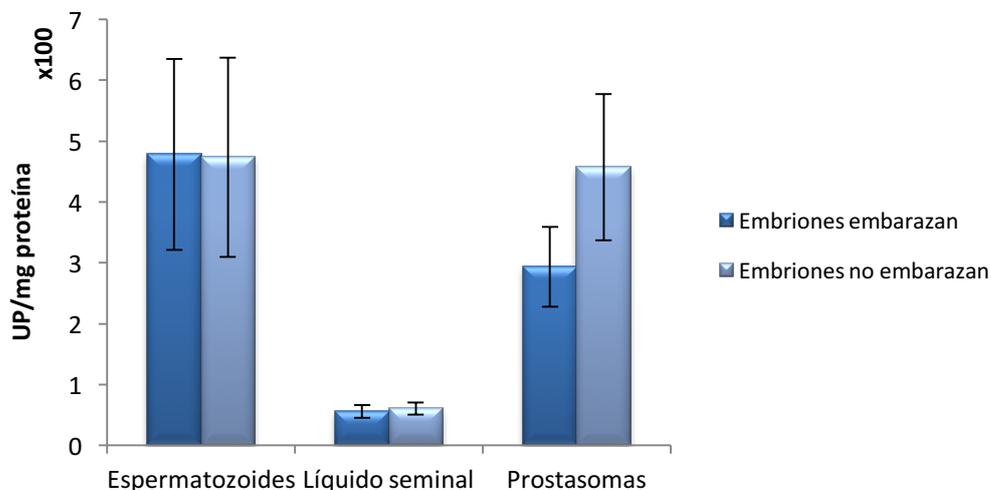
**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DPP IV EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE SI SE CONSIGUE EMBARAZO O NO**



**Figura 39.** Niveles de actividad de la enzima DPP IV en fracciones seminales correspondientes a embriones que embarazan y no embarazan.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

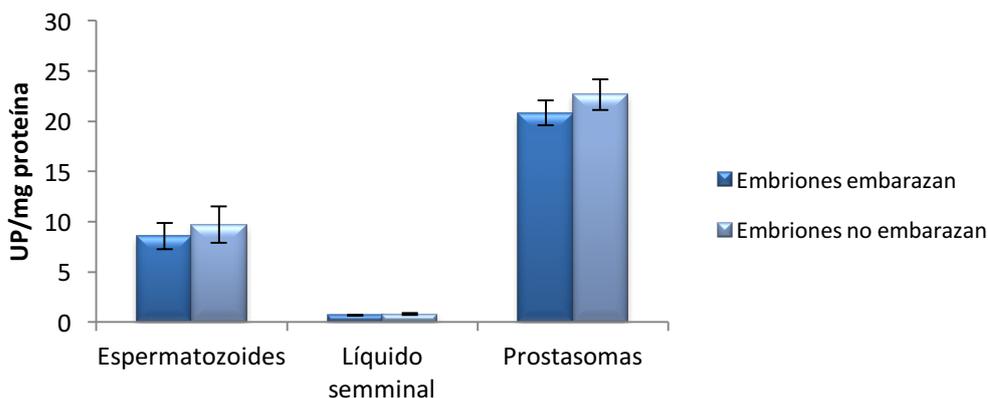
**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE SI SE CONSIGUE EMBARAZO O NO**



**Figura 40.** Niveles de actividad de la enzima PEP en fracciones seminales correspondientes a embriones que embarazan y no embarazan.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA NEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE SI SE CONSIGUE EMBARAZO O NO**



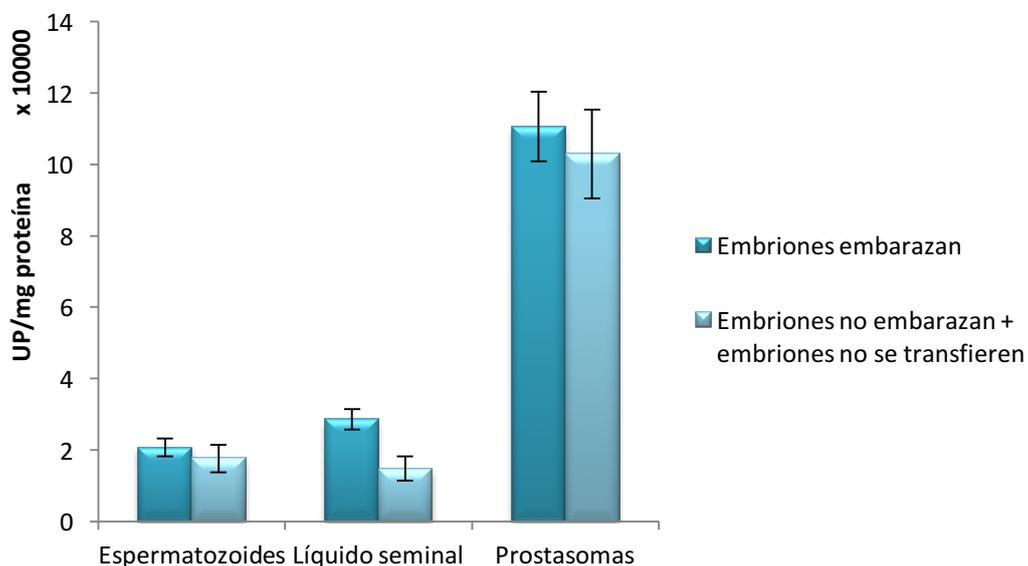
**Figura 41.** Niveles de actividad de la enzima NEP en fracciones seminales correspondientes a embriones que embarazan y no embarazan.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

La última relación estudiada dentro de la evolución del embarazo es la actividad enzimática en cada una de las fracciones espermáticas correspondientes a dos grupos de embriones: por una parte, los embriones que dan lugar a embarazo y por otra parte los que no dan lugar junto con los que no tienen calidad para ser transferidos. Esto se realizó mediante el test Mann-Whitney.

La actividad de la enzima APN fue mayor en las muestras seminales que dieron lugar a embarazo frente a los que no dieron lugar a embarazo, o no fueron transferidos en las tres fracciones estudiadas (Figura 42). El análisis de la DPP IV también reveló en las tres fracciones mayor actividad de la enzima en las muestras espermáticas del grupo de embriones que dieron lugar a embarazo, aunque con niveles similares a las correspondientes al grupo de embriones que no dieron lugar o no fueron transferidos (Figura 43). La enzima PEP tuvo mayor actividad las muestras correspondientes al grupo de embriones que no dieron lugar a embarazo o que no fueron transferidos frente a las del grupo de embriones que sí dieron lugar a embarazo, especialmente en la fracción de prostasomas (Figura 44). La actividad de NEP fue semejante para ambos grupos en las tres fracciones, (Figura 45). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

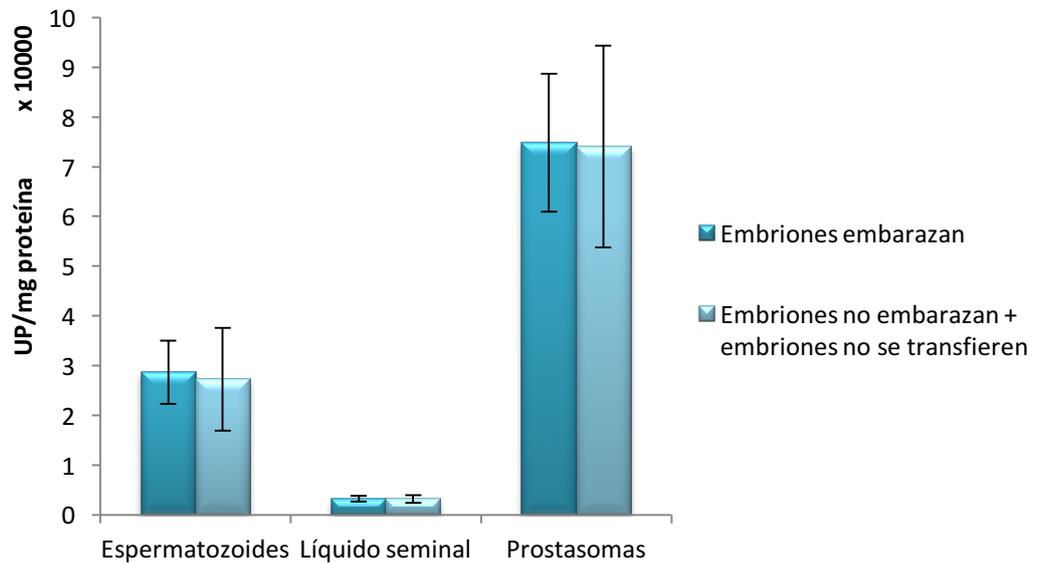
### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA APN EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL DE EMBARAZO



**Figura 42.** Niveles de actividad de la enzima APN en fracciones seminales correspondientes a embriones que embarazan y no embarazan o no se transfieren.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

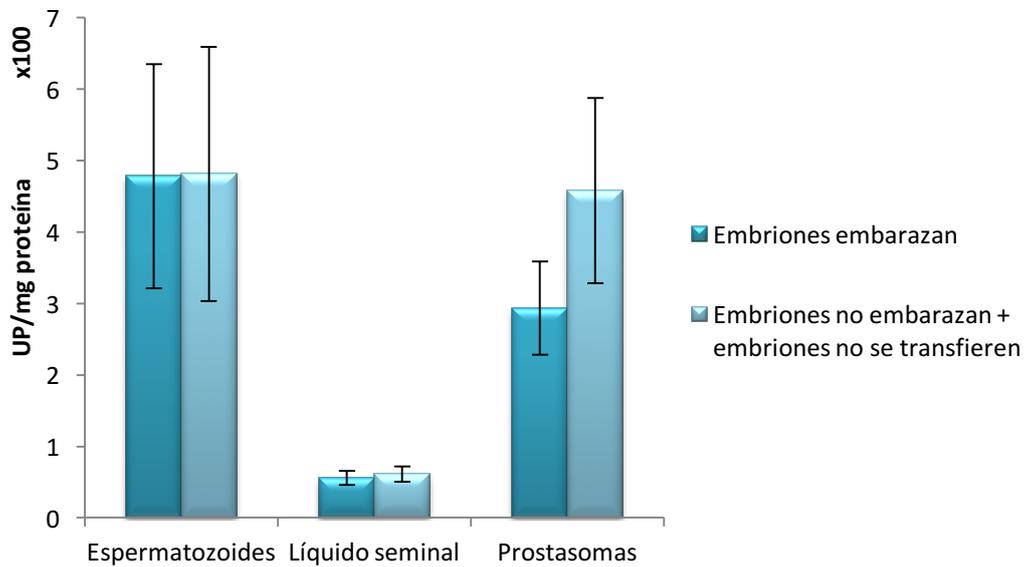
**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DPP IV EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL DE EMBARAZO**



**Figura 43.** Niveles de actividad de la enzima DPP IV en fracciones seminales correspondientes a embriones que embarazan y no embarazan o no se transfieren.

*La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$*

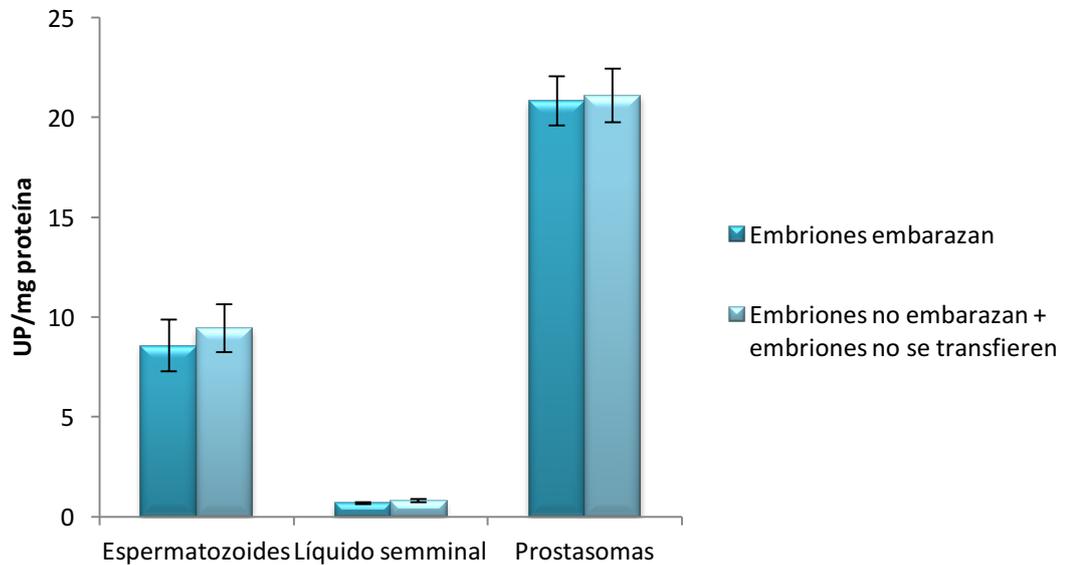
### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL DE EMBARAZO



**Figura 44.** Niveles de actividad de la enzima PEP en fracciones seminales correspondientes a embriones que embarazan y no embarazan o no se transfieren.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA NEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL DE EMBARAZO**



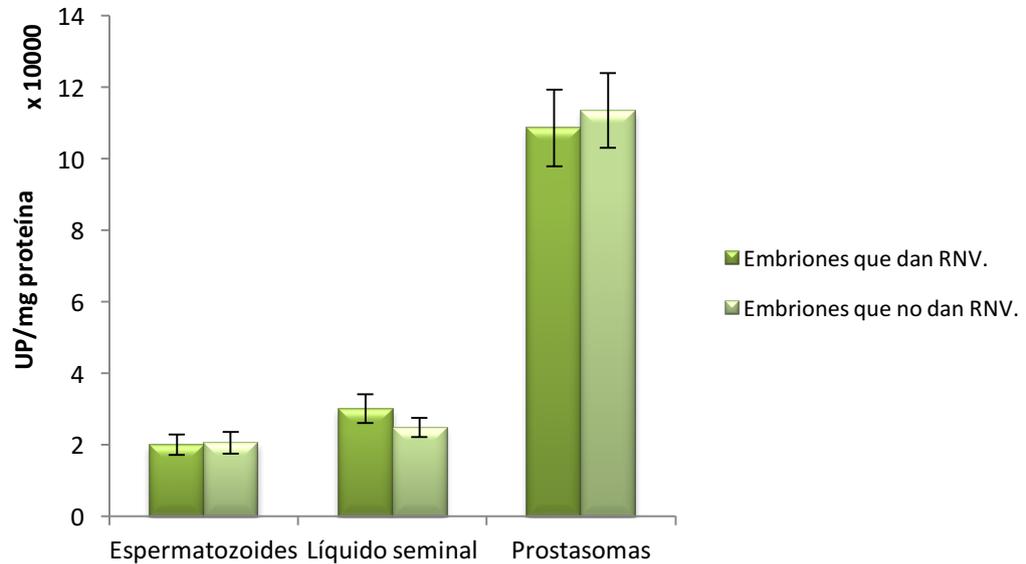
**Figura 45.** Niveles de actividad de la enzima NEP en fracciones seminales correspondientes a embriones que embarazan y no embarazan o no se transfieren.

*La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$*

#### **4.7. Actividades peptidásicas seminales y tasa de recién nacido vivo**

A continuación, se exponen los resultados del análisis de la relación entre la actividad enzimática en fracciones seminales y los embriones que tras su implantación dan lugar a un recién nacido vivo (embriones que dieron lugar a recién nacido vivo y embriones que no dieron lugar a recién nacido vivo). El análisis se realizó mediante el test Mann-Whitney.

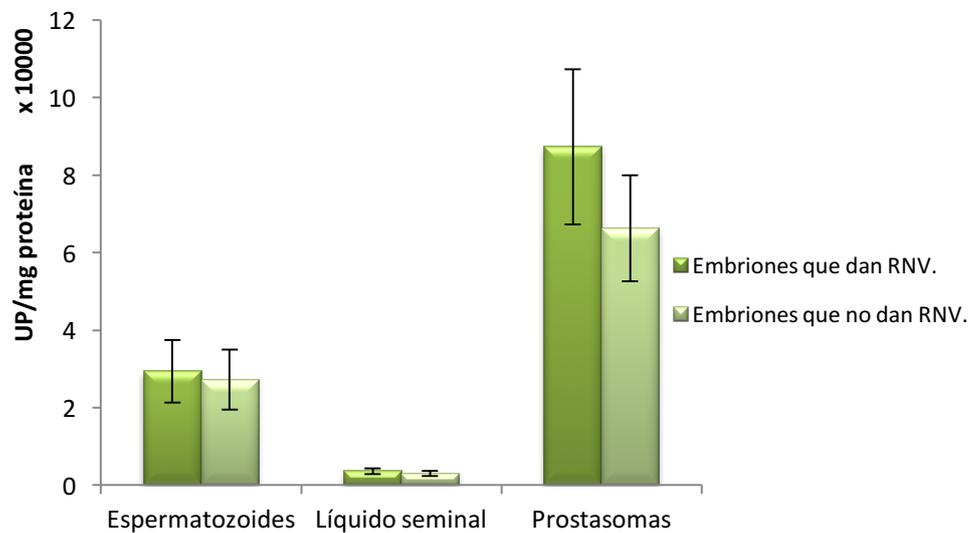
El ensayo enzimático de la APN mostró mayor actividad en el líquido seminal correspondiente al grupo de embriones que dieron lugar a recién nacido vivo en comparación con el grupo de embriones que no lo dieron (Figura 46). El análisis de DPPV IV mostró mayor actividad enzimática en las tres fracciones seminales para el grupo correspondiente a embriones que dieron lugar a recién nacido vivo (Figura 47). La enzima PEP mostró mayor actividad en las tres fracciones correspondientes al grupo de embriones que dieron lugar a recién nacidos vivos (Figura 48). El análisis de la enzima NEP mostró niveles de actividad similares para ambos grupos en las tres fracciones, con mayor actividad de en los prostasomas correspondientes a los embriones que dieron lugar a recién nacido vivo respecto a aquellas que no dieron lugar a recién nacido vivo (Figura 49). No se hallaron diferencias intergrupales estadísticamente significativas en el análisis de la actividad enzimática.

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA APN EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE SI HAY RECIEN NADIDO VIVO O NO**

**Figura 46.** Niveles de actividad de la enzima APN en fracciones seminales correspondientes a embriones que dan lugar y no dan lugar a un recién nacido vivo.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$ . RNV: recién nacido vivo

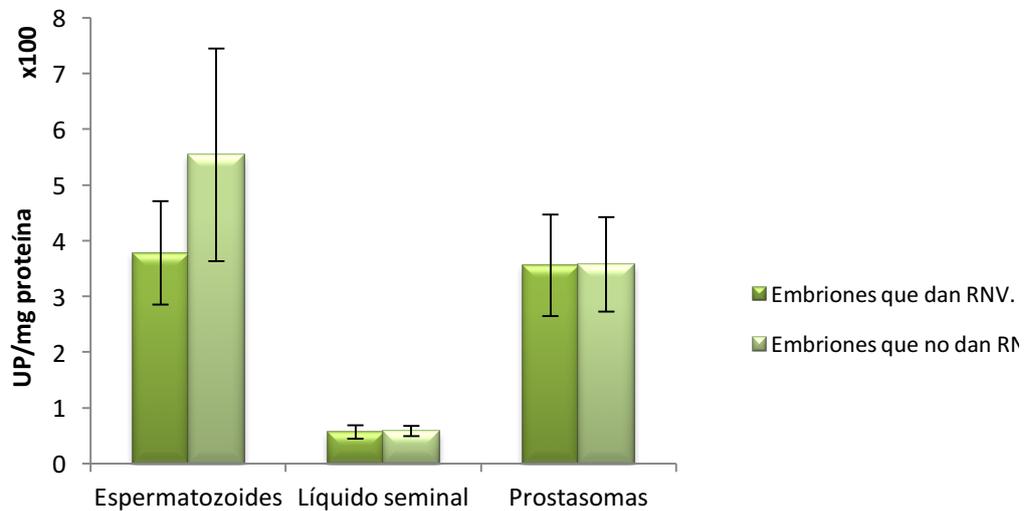
### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DPP IV EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE SI HAY RECIÉN NADIDO VIVO O NO



**Figura 47.** Niveles de actividad de la enzima DPP IV en fracciones seminales correspondientes a embriones que dan lugar y no dan lugar a un recién nacido vivo.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$ . RNV: recién nacido vivo

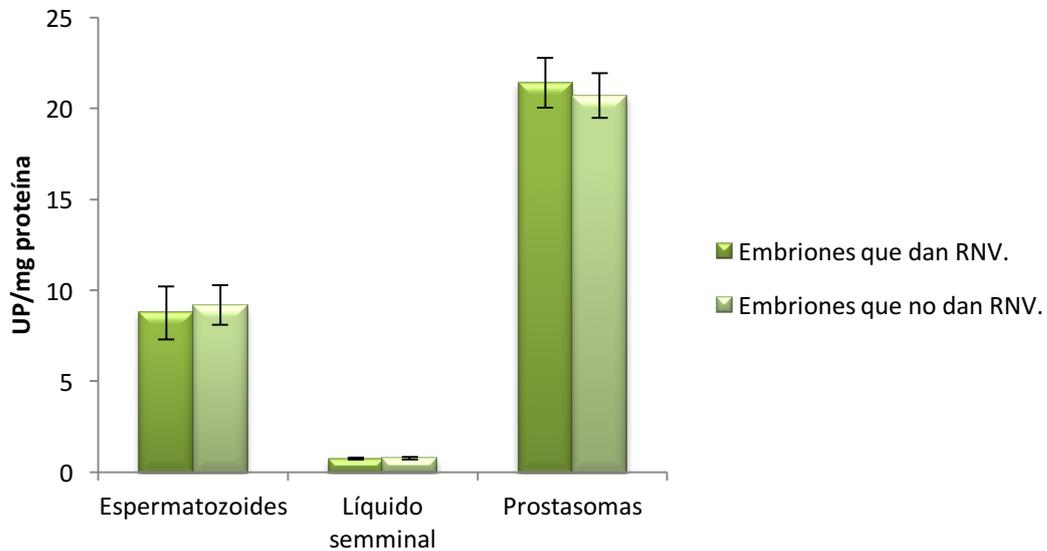
**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE SI HAY RECIEN NADIDO VIVO O NO**



**Figura 48.** Niveles de actividad de la enzima PEP en fracciones seminales correspondientes a embriones que dan lugar y no dan lugar a un recién nacido vivo.

*La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$ . RNV: recién nacido vivo*

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA NEP EN FRACCIONES SEMINALES EN FUNCIÓN DE SI HAY RECIEN NADIDO VIVO O NO**



**Figura 49.** Niveles de actividad de la enzima NEP en fracciones seminales correspondientes a embriones que dan lugar y no dan lugar a un recién nacido vivo.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representa la media  $\pm$  ES y los valores estadísticamente significativos, \*  $P < 0,05$ . RNV: recién nacido vivo

## **V. Discusión**



La infertilidad afecta a unos 70 millones de personas en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que el 9% de las parejas en todo el mundo sufren problemas de fertilidad y de este porcentaje el 50% son debidos a un factor masculino (Fainberg y cols., 2019; Wu y cols., 2022) por lo que se ha convertido en problema de gran importancia tanto a nivel medico como social. Las técnicas de reproducción asistida, que aúnan diversos tratamientos destinados a resolver los trastornos de fertilidad, son las que han están ayudado a las personas con estos problemas de infertilidad a aumentar las posibilidades de su éxito reproductivo (Khorram y cols.,2001; Chemes y Álvarez Sedo, 2012).

La infertilidad masculina puede ser provocada por una gran variedad de causas. Algunas de ellas se pueden identificar y tratar como el hipogonadismo hipogonadotrópico donde los testículos no son funcionales debido a que el hipotálamo es incapaz de secretar cantidades normales de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas); otras se logran diagnosticar, pero no cuentan con un tratamiento específico, como alteraciones genéticas o atrofia testicular. En el 30-40% de los pacientes con alteraciones del espermograma, el examen físico y las pruebas de laboratorio, no se logra identificar la causa específica de la infertilidad, clasificando a estos pacientes como portadores de una infertilidad masculina idiopática (Jungwirth y cols., 2012, Fainberg y cols., 2019)

El proceso de diferenciación de los gametos masculinos tiene su origen en los túbulos seminíferos y se conoce como espermatogénesis. Los gametos masculinos son haploides ya que solo contienen la mitad del número total de cromosomas que va a tener un embrión. Por ello, la importancia que tienen los estudios que analizan factores que puedan ayudar a la selección de la mejor muestra masculina para conseguir embriones con la calidad necesaria para que se pueda conseguir un embarazo.

La herramienta diagnóstica que se usa en las clínicas de reproducción asistida para evaluar la muestra de semen es su análisis mediante un seminograma donde se analizan parámetros macroscópicos, como el volumen y el pH seminal y párametros microscópicos, como la morfología, movilidad y concentración de espermatozoides. Sin embargo, esta prueba presenta limitaciones ya que con ella no podemos analizar procesos

## Discusión

celulares y moleculares que ocurren en el interior del espermatozoide ya conocidos en la infertilidad como puede ser la integridad de su ADN o la apoptosis (Guzick y cols., 2001; Lewis, 2007; Garrido y cols., 2008). En los tratamientos de reproducción asistida la consideración de los espermatozoides ha ido evolucionado a lo largo de los años. Los primeros métodos de selección de espermatozoides se preocupaban en seleccionar los espermatozoides móviles y de apariencia morfológicamente normal, pero se sabe que estos métodos son ineficientes para identificar los espermatozoides más adecuados para la fecundación haciendo uso de métodos como la selección de espermatozoides no apoptóticos, morfológicamente normales, altamente móviles, con membranas intactas y de alta integridad en su ADN para el uso en tratamientos de reproducción asistida (Yetunde y cols., 2013).

Una revisión de Ribas-Maynou y colaboradores en 2022 nos vuelve a hablar de la necesidad de desarrollar estrategias más avanzadas de selección de espermatozoides para los tratamientos de reproducción asistida. Este hecho nos lleva a pensar que el uso de biomarcadores moleculares basados en la fisiología espermática podría complementar los análisis actuales mejorando el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina, o prediciendo los resultados de las técnicas de reproducción asistida (Samplaski y cols., 2010).

En el presente trabajo se ha tratado de buscar un vínculo entre posibles marcadores bioquímicos seminales asociados al funcionamiento espermático y la calidad de los embriones obtenidos en tratamientos de reproducción asistida. Esto se ha llevado a cabo en varios pasos. En una primera fase se ha realizado análisis de los biomarcadores moleculares relacionándolos con los parámetros de calidad seminal. En una segunda fase se ha profundizado en el estudio de los niveles de estos biomarcadores en diferentes fracciones seminales, relacionándolos con la tasa de fecundación, los principales marcadores de calidad embrionaria y las tasas de éxito del tratamiento de reproducción asistida. Para analizar estas posibles interacciones se han acometido los análisis enzimáticos en las mismas muestras seminales con las que se fecundaron los ovocitos y la obtuvieron los embriones que posteriormente se han transferido a las

pacientes para conseguir un embarazo. De esta manera se puede conseguir un análisis directo donde los resultados del análisis enzimático se pueden relacionar con la calidad embrionaria, con el fin de realizar un análisis previo del semen que sirva de pronóstico de la calidad embrionaria.

Es conocido que la calidad seminal tiene una influencia directa en la fecundación y en el desarrollo embrionario (Lasiene y cols., 2013). Ya existen estudios donde se relacionan las enzimas del metabolismo peptídico con la fertilidad (Fernandez y cols., 2002; Valdivia y cols., 2004; Irazusta y cols., 2004; Subirán y cols., 2011; Gianzo y cols., 2016, 2018, 2020, 2022; Aparicio y cols., 2022) por esta razón se ha estudiado la relación de la actividad peptidásica en semen con los parámetros de calidad seminal más relevantes, donde la valoración en día 2 y 3 de desarrollo se efectúa a las 44 y a las 68 horas después de la inseminación (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Los parámetros más relevantes a estudiar para seleccionar los embriones con mejores tasas de embarazo ya están establecidos en la práctica clínica de los laboratorios de reproducción asistida. Sela y colaboradores en 2012 ya nos dicen que una clasificación embrionaria que pueda predecir el potencial implantatorio del embrión debe establecerse combinando el grado de fragmentación, el número de blastómeras y el patrón de división en día 2 y 3 de desarrollo.

Respecto al número de células, los embriones deberían estar en un estadio óptimo en 4 células en día 2 de desarrollo (Munné, 2006; Holte y cols., 2007; Scott y cols., 2007) y en 7 u 8 células en día 3 de desarrollo (Magli y cols., 2007; Finn y cols., 2010).

El estudio de la fragmentación en los estadios tempranos del desarrollo se realiza porque se sabe que la presencia de fragmentación reduce la viabilidad del embrión debido a anomalías que acaban provocando un bloqueo embrionario (Racowsky y cols., 2009; Pelinck y cols., 2010).

Del mismo modo la falta de simetría de las blastómeras se asocia con una disminución en la capacidad implantatoria (Steer y cols., 1992; Veeck,

## Discusión

1999b; Van Blerkom y cols., 2000; De Placido y cols., 2022; Hnida y cols., 2004)

En relación a la multinucleación se sabe que es un parámetro de valor predictivo de la viabilidad de un embrión (Jackson y cols., 1998; Van Royen y cols., 2001, 2003; Meriano y cols., 2004; Cuadros y cols., 2011).

Tres de las péptidasas analizadas en este trabajo (APN, PEP y NEP) han sido descritas en los gametos masculinos humanos, en los que actúan sobre distintas funciones fisiológicas relacionadas con la reproducción (Vinson y cols., 1997).

Si bien la DPP IV es una actividad descrita en las fracciones de líquido seminal y prostasomas, que son, a su vez, vesículas del exosoma seminal que se fusionan con la membrana espermática, de manera espontánea a pH ligeramente ácido (Arienti y cols., 1997a) (este es un proceso que se da de manera natural en el tracto femenino). De esta manera, la actividad DPP IV es descrita por primera vez en los espermatozoides del eyaculado, antes de la fusión con los prostasomas.

En esta tesis se ha profundizado en el papel de estas cuatro peptidasas implicadas en la fisiología espermática, y su relación con los parámetros seminales, embrionarios y con los resultados de las técnicas de reproducción asistida.

## **5.1. Relación entre la actividad enzimática e indicadores de calidad seminal**

La APN es una enzima que regula funciones importantes en el cuerpo, asociadas con el crecimiento y el desarrollo (Mina-Osorio, 2008).

Los primeros trabajos que indagan la relación entre fertilidad y la enzima APN describieron la implicación de la mencionada enzima en la reacción acrosómica de los espermatozoides de mejillón (Togo y Morisawa, 1997). En la misma línea, se ha descrito la existencia de una relación entre marcadores moleculares en espermatozoides humanos y calidad embrionaria (Garrido y cols., 2008).

Como se ha descrito anteriormente, la APN es una enzima que se puede detectar en espermatozoides, líquido seminal y la fracción de prostasomas (Fernandez y cols., 2002; Irazusta y cols., 2004; Subirán y cols., 2008), constituyendo entre el 0,5 y 1 % de las proteínas del plasma seminal (Carisson y cols., 2006). Se ha probado que las proteínas del plasma seminal tienen un papel importante en la regulación de la fertilidad masculina a nivel de la movilidad, estabilización de la membrana plasmática y prevención de la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Juyena y cols., 2012).

Entre los hallazgos de esta tesis se encuentra haber demostrado la existencia de una relación estrecha entre la actividad de APN y los parámetros seminales de mayor interés clínico. En este sentido, encontramos una correlación significativa e inversa de la concentración de APN en la fracción de líquido seminal con la concentración espermática y con el porcentaje de espermatozoides progresivos. Por otra parte, la concentración de APN en la fracción de líquido seminal correlacionó positivamente con el porcentaje de espermatozoides no progresivos.

De manera similar, en otros trabajos de este mismo grupo investigador se ha demostrado la relación existente entre la actividad de la APN y la concentración seminal en la fracción de espermatozoides. Por ejemplo, Irazusta y colaboradores, en 2004, probaron que en hombres con astenozoospermia y necrozoospermia la actividad de la APN se encuentra

## Discusión

aumentada con respecto a las muestras normozoospermicas. Por otro lado, Subirán y colaboradores (2008, 2010), tras haber logrado mejorar la movilidad mediante la inhibición de la APN, demostraron que la APN afecta negativamente a la movilidad espermática. En esta misma línea, otros autores han señalado la posibilidad de que de un péptido inhibidor endógeno de la APN llamado opiorfina y que se localiza en la fracción del plasma seminal ayude a la movilidad de los espermatozoides (Bosler y cols., 2014)

Una baja expresión APN seminal está asociada con un mayor porcentaje de espermatozoides inmóviles y con un mayor porcentaje de espermatozoides con movilidad no-progresiva (Gianzo y cols., 2022), de manera que, aunque en distinto sentido, observamos que esta enzima tiene una relación con la motilidad espermática y la calidad seminal como ya se había descrito en estudios anteriores

En relación a otros aspectos relacionados con la calidad seminal, sabemos que la actividad APN está relacionada de manera directa con una mayor fragmentación del DNA (Aparicio y cols., 2022), característica de los espermatozoides proapoptóticos, lo que relacionaría de manera indirecta la actividad de este enzima con una espermatogénesis anómala. Esto podría explicar una menor concentración de espermatozoides en el eyaculado, así como un aumento de los niveles de espermatozoides con peor motilidad, en relación a actividades elevadas de APN. También ha sido descrita una menor actividad APN en espermatozoides de ratón de buena motilidad, y un descenso del porcentaje de espermatozoides de peor motilidad al ser tratadas las muestras seminales murinas con inhibidores de la APN (Khatun y cols., 2018)

Por otra parte, se ha descrito una peor calidad seminal en muestras de pacientes adictos a heroína, un opiáceo exógeno, principalmente en lo referido a motilidad espermática, que además coincidía con una menor expresión de los genes que codifican las enzimas degradadoras de encefalinas (opioides endógenos) estudiadas en esta tesis, APN y NEP (Rezaei-Mojaz y cols., 2014). Aunque en nuestro caso, una mayor actividad de dichos enzimas, APN fundamentalmente, en distintas fracciones, se correlaciona con una peor calidad seminal, en el estudio citado se describe

únicamente una menor expresión de las citadas enzimas en los espermatozoides, sin describir directamente los niveles de actividad en ninguna de las fracciones seminales aquí descritas. De cualquier manera, toda la evidencia coincide en que fundamentalmente la actividad APN, pero también la NEP, degradadoras ambas de péptidos opioides endógenos y de algunos de los péptidos bioactivos del Sistema Renina Angiotensina, tienen relación directa con la calidad espermática.

Dado que solamente los espermatozoides móviles pueden alcanzar el ovocito y fecundarlo, en base a estos resultados, en la práctica clínica podría utilizarse la actividad de la APN en la fracción seminal, así como en la fracción de espermatozoides, como factor predictor de la fertilidad masculina.

Los prostasomas son vesículas presentes en el semen humano. Son secretadas por la próstata y contienen grandes cantidades de colesterol y proteínas, de las cuales algunas son enzimas. Los prostasomas están involucrados en una serie de procesos biológicos, uno de ellos es la transferencia de biomoléculas como los lípidos y proteínas a la membrana de los espermatozoides, mediante un proceso de fusión que se produce a un pH neutro o ligeramente ácido. Tradicionalmente se ha considerado que la DPP IV, que no tiene actividad enzimática en los espermatozoides, se transfiere desde los prostasomas, aunque en este estudio describimos esta actividad en los espermatozoides. Esto puede ser de particular interés ya que, mediante este procedimiento, los espermatozoides pueden adquirir nuevas enzimas unidas a la membrana y modificar la actividad catalítica de su superficie (Arienti y cols., 1997a). En nuestro estudio observamos una mayor actividad de la enzima DPP IV en la fracción de prostasomas de muestras con menor concentración espermática.

En el trabajo de Turunen y colaboradores en 2022 se describe que la abundancia de las enzimas NEP y DPP IV se asoció positivamente con la velocidad espermática y la proporción de espermatozoides hiperactivados. Además, una mayor abundancia de NEP se asoció con una mayor proporción de espermatozoides móviles a los 90 min. En resumen, estos hallazgos indican que la variación tanto en la composición del líquido seminal en su

## Discusión

conjunto como en sus proteínas específicas puede tener un papel importante en la determinación de la función espermática.

Se sabe que la proteína DPP IV, juega un papel durante la espermatogénesis y también participa en la estimulación del metabolismo mitocondrial de los espermatozoides (Shaw y Nath 2015; An y cols., 2018), es decir, la producción de energía, crucial para la movilidad de los espermatozoides. Es importante destacar que una menor abundancia de DPP IV en líquido seminal se ha relacionado con una menor motilidad de los espermatozoides en hombres que padecen diabetes mellitus tipo 2 (An y cols., 2018). Por lo tanto, podría explicar la disminución de la fertilidad masculina comúnmente observada en pacientes diabéticos. En nuestro estudio, en cambio, observamos una correlación negativa entre la actividad DPP IV en los espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides progresivos.

Uno de los sustratos endógenos de la DPP IV, el péptido GRP (*Gastrin Releasin Peptide*, similar a la bombesina), parece tener un efecto estimulador de la reacción acrosómica en espermatozoides humanos, en estudios realizados in vitro (Levy y cols., 1996). De esta manera, niveles altos de DPP IV en el líquido seminal o en los prostasomas, podrían sugerir un efecto regulador de la reacción acrosómica, cuyo papel es fundamental en la fecundación.

Otro de los péptidos bioactivos susceptible de ser degradado por la DPP IV es el GLP-1 (*Glucagon Like Peptide 1*). Está descrito que el receptor de este péptido está presente en la membrana de los espermatozoides (Rago y cols., 2020). Este péptido de la familia de las incretinas, está relacionado con la reducción de la hiperglicemia asociada a la obesidad que, a su vez, está asociada a subfertilidad (Zhang y cols., 2015) y alteraciones en la espermatogénesis (Ellis y cols., 1994). Aunque no hay evidencias aun de la presencia de GLP-1 en el semen humano, se ha observado que el tratamiento con análogos del GLP-1 pueden mejorar el recuento de espermatozoides en el eyaculado (Andersen y cols., 2022). De esta manera, la DPP IV podría tener una función reguladora en procesos esenciales del metabolismo de los espermatozoides.

La Sustancia P es un péptido que se expresa en las células espermáticas (Pinto y cols., 2010) y aumenta la motilidad espermática in vitro (Ravina y cols., 2007) junto con otras taquicininas, una familia de péptidos bioactivos que son regulados, entre otros enzimas, por la DPP IV y la NEP. Se ha descrito que el tratamiento con Sustancia P puede mejorar la producción de espermatozoides en modelos murinos de azoospermia secretora (Chen y cols., 2021). Por tanto, niveles alterados de la DPP IV, degradadora de taquicininas como la Sustancia P, en alguna de las fracciones seminales podrían estar relacionados con recuentos anormales de espermatozoides en el eyaculado o una motilidad espermática alterada.

La asociación positiva observada entre los niveles de NEP y la velocidad de nado de los espermatozoides (Turunen y cols., 2022) está de acuerdo con algunos estudios anteriores, que han demostrado que la NEP regula los niveles de encefalinas (degradándolas) que se sabe que inhiben la motilidad de los espermatozoides a través de la activación del sistema opioide en los espermatozoides (Aguirregoitia y cols., 2006, 2012; Subirán y cols., 2010). En otras palabras, la NEP degrada las moléculas de señalización que son responsables de la activación de una cascada de señales que finalmente daría como resultado la inhibición de la movilidad de los espermatozoides.

Subirán y colaboradores en 2010 ya explican que la endopeptidasa neutra del plasma seminal (NEP) afecta de manera adversa la movilidad y la trayectoria de los espermatozoides capacitados en humanos. De acuerdo con la hipótesis de que la NEP afecta adversamente a la movilidad de los espermatozoides, explican que la inhibición de la NEP con inhibidores sintéticos mejoró la movilidad de los espermatozoides. Aunque en nuestros resultados no hemos encontrado una correlación significativa con la movilidad, se observa que, con una mayor actividad de la enzima NEP en líquido seminal, la movilidad se ve disminuida. A su vez se detecta una correlación significativa con el porcentaje de espermatozoides anormales, lo cual puede ser un motivo de infertilidad.

## **5.2. Actividades peptidásicas seminales y tasa de fecundación**

La tasa de fecundación es uno de los parámetros más importantes en los tratamientos de reproducción asistida. Es primordial tener una buena tasa de fecundación para que los tratamientos tengan éxito, de cara a poder optimizar al máximo los ciclos de reproducción asistida. Por ello, en los laboratorios de reproducción se realiza un seguimiento exhaustivo de este indicador, intentando obtener la mejor tasa para tener el máximo rendimiento con el número limitado de ovocitos obtenido por ciclo del que se dispone para fecundar. Para ello se ha evolucionado en las técnicas de fecundación como el uso, ya altamente extendido, de la microinyección intracitoplasmática (Xu y cols.,2022) o incluso con nuevas estrategias como puede ser la microinyección intracitoplasmática de rescate que se efectúa 16-18 horas después de la fecundación (Jiang y cols., 2021). De esta manera se podría obtener una mayor tasa de fecundación que conllevaría un mayor número de embriones donde poder seleccionar, para transferir a la paciente. El desarrollo de estas técnicas puede marcar la diferencia entre tener o no tener embriones transferibles, limitando los fallos de fecundación.

Los resultados obtenidos en esta investigación revelan una correlación negativa significativa de la actividad de la enzima NEP en la fracción de espermatozoides y la tasa de fecundación. Estos resultados sugieren que la actividad de la enzima NEP está relacionada con la tasa de fecundación y por ello podría ser usada como un indicador de pronóstico de la misma, cuando los pacientes se van a someter a un tratamiento de reproducción asistida. Esta información puede ser interesante para lograr la elección del tratamiento más adecuada para cada paciente.

Como ya se ha demostrado, la NEP regula los niveles de encefalinas (degradándolas) y estas inhiben la movilidad de los espermatozoides a través de la activación del sistema opioide (Aguirregoitia y cols., 2006; Subirán y cols., 2010). Es decir, la NEP degrada las moléculas de señalización que pueden ser finalmente responsables de la inhibición de la movilidad de los espermatozoides, lo que se puede relacionar con una

bajada en la tasa de fecundación. Distintos estudios sugieren que la movilidad de los espermatozoides está relacionada con su capacidad de fecundación (Larsen y cols., 2000; Hirano y cols., 2001; Rhemrev y cols., 2001). Por otra parte, ha sido descrita una menor tasa de fecundación en modelos knockout de *Drosophila* para la enzima NEP (Ohsako y cols., 2021).

Una revisión bibliográfica del 2022 concluye que la efectividad de los tratamientos de fecundación *in vitro*, incluyendo parámetros de la tasa de fecundación, depende de muchos factores, entre los que se encuentran las características de los espermatozoides y donde refieren que la suplementación con antioxidantes puede ser beneficiosas para una mejor calidad del semen (Dabbagh Rezaeiyyeh y cols., 2022). La detección de inhibidores endógenos de la NEP en plasma seminal y el hecho de que la suplementación con opiorfinas en muestras de semen mejora la movilidad de los espermatozoides, haciendo esto que su potencial fecundante sea mayor, sugeriría una implicación directa del sistema opioide en la fecundación (Bosler y cols., 2022).

Es bien conocido que los opiáceos estimulan la secreción de prolactina, que al inhibir la actividad del hipotálamo, inhibe a su vez el eje hipotálamo-hipófisis y provoca hipogonadismo hipogonadotrópico (Semet y cols., 2017). Este hecho puede reducir el nivel de testosterona intratesticular, aunque los efectos que esto tiene sobre los gametos (efectos en su desarrollo o en su posible funcionalidad) siguen siendo difícil de evaluar, al contrario que otros efectos como las alteraciones en la función sexual (Pake y cols., 1994; Cicero y cols., 2002; Daniell, 2002). Según el trabajo de Katz y Mazer (2009), el consumo de opioides a largo plazo induce hipogonadismo debido a la supresión central de la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotropina, influyendo en la producción de testosterona y en consecuencia afectando a la fertilidad masculina y a la tasa de fecundación. De hecho, los opioides causan infertilidad ya que tienen un efecto negativo en la liberación de la testosterona (Yilmaz y cols., 1999; Schlosser y cols., 2007; Gratzke y cols., 2010).

Se sabe que los opioides pueden tener un efecto directo sobre los agentes oxidantes provocando una elevación del estrés oxidativo. Por eso, los agentes antioxidantes pueden ser útiles para prevenir el efecto dañino del

## Discusión

estrés oxidativo provocado por el consumo de drogas de las personas adictas (Sadat-Shirazi y cols., 2020). Se cree que el estrés oxidativo está involucrado en la fisiopatología de la infertilidad masculina (Semet y cols., 2017). Afectando, entre otros fenómenos, a la pérdida de integridad de la membrana y del ADN espermático. De esta manera, podría resultar alterada su capacidad para fecundar el ovocito, (Bolle y cols., 2002). Varios estudios sugieren que la suplementación con antioxidantes orales (vitaminas C y E, zinc, selenio, folatos, carnitina y carotenoides) podría mejorar la calidad del esperma en pacientes infértiles cuyo semen contiene un exceso de ROS (evidenciado por la reducción de la fragmentación del ADN y aumento de la motilidad de los espermatozoides) (Ross y cols., 2010), lo que quizá pueda tener un efecto en la capacidad de fecundación.

### **5.3. Actividades peptidásicas seminales y calidad embrionaria e implantación**

Los parámetros de calidad embrionaria son la herramienta de la que se dispone en los laboratorios de reproducción asistida para efectuar una buena selección del embrión a transferir. En las clínicas de fertilidad se valoran los embriones tanto en día 2 como en día 3 de desarrollo embrionario. Destacando el porcentaje de fragmentación, la simetría, la multinucleación y el de número de células en el embrión, en el que es especialmente relevante el que el aumento de células tenga un dinamismo determinado, siendo lo ideal que los embriones se dividan de 4 a 8 células del día 2 al 3 de desarrollo embrionario.

Ya que la calidad del embrión es uno de los predictores principales del éxito de los tratamientos de reproducción asistida, en esta investigación se ha indagado en la posible relación entre las enzimas APN, DPP IV, PEP y NEP seminales y el desarrollo embrionario en humanos, con el fin de evaluar el uso potencial de estas 4 enzimas del esperma humano como biomarcadores moleculares para identificar embriones de alta calidad y, por tanto, mejorar el éxito reproductivo durante los tratamientos de reproducción asistida.

Existen características moleculares del esperma (las proteínas implicadas en la movilidad, integridad de la membrana, capacitación) que están involucradas en la fecundación y el desarrollo embrionario (Janny y Menezo, 1994; Barroso y cols., 2009; Govindaraju y cols., 2012; Gianzo y cols., 2018). Entre estas características, la actividad de la enzima APN puede afectar al desarrollo embrionario (Khatun y cols., 2017, 2018). La APN, es una enzima unida a la superficie de la membrana y que está ampliamente expresada en las superficies celulares de los tejidos humanos (Hooper, 1994; Mina-Osorio, 2008). Esta enzima juega un papel fundamental en muchos procesos fisiológicos y patológicos, tales como diferenciación celular, quimiotaxis y movilidad, todos ellos procesos relacionados con el desarrollo embrionario. Además, actúa como receptor viral, interviniendo en las vías de señalización asociadas al dolor, y regulando la presión arterial, la fagocitosis y la fertilidad, entre otros (Chen y cols., 2012, Mina-Osorio, 2008). La APN está presente tanto en el esperma como en las

## Discusión

fracciones seminales (Fernandez y cols., 2002; Subirán y cols., 2008), y los estudios funcionales han analizado el papel de este enzima en la movilidad espermática (Subirán y cols., 2008, 2010) y en la regulación de la reacción del acrosoma (Togo y Morisawa, 1997, 2004; Viudes de Castro y cols., 2015). Además, se han hallado alteraciones en la actividad de la APN en el semen de pacientes subfértiles (Irazusta y cols., 2004), y se ha descrito que una actividad APN alterada en el semen afecta el desarrollo embrionario temprano, reforzando la idea de que esta enzima puede jugar un papel clave en las primeras etapas del desarrollo (Gianzo y cols., 2022).

Este fenómeno es de gran importancia, ya que para que se desarrolle un embrión es necesario que se dé una interacción eficaz entre el espermatozoide y el ovocito, por lo tanto, la integridad funcional de ambas células es extremadamente importante (Juneja y cols., 1995). Si aumenta la toxicidad celular, puede causar un daño en el ADN y aumentar el estrés oxidativo en los espermatozoides, lo que posteriormente afectará a su movilidad (Oluwakemi y cols., 2016). Además, la calidad del ADN espermático tiene una influencia directa en el desarrollo del embrión humano (Simon y cols., 2014, 2017; Ni y cols., 2014). Se sabe que los ovocitos son capaces de reparar el daño del ADN de los espermatozoides, por lo que un espermatozoide con fragmentación en su ADN puede fecundar con éxito un ovocito. Ésta capacidad reparadora dependerá fundamentalmente de dos factores relacionados entre sí, esto es, de los efectos acumulativos del daño de la cromatina espermática, así como de la capacidad reparadora del ovocito (Gawecka y cols., 2013).

En los resultados obtenidos se observan las siguientes correlaciones significativas de la enzima APN en las fracciones de líquido seminal: negativa respecto al número de células en día 2 de desarrollo, positiva respecto al porcentaje de fragmentación en día 2 y 3. Por último, se ve que a más actividad enzimática de la APN en esta misma fracción se observan más embriones de simetría tipo 2 tanto en día 2 como en día 3 de desarrollo. Estos resultados nos hacen pensar que una mayor actividad APN seminal podría indicar una peor calidad embrionaria, ya que un semen con una mayor actividad de la enzima APN en la fracción de líquido seminal podría dar embriones con un número menor de células, una mayor fragmentación

y una peor simetría, todos ellos parámetros asociados a una peor calidad embrionaria. Khatun y colaboradores demostraron en 2017 que la acción de APN en el medio puede inhibir de manera significativa el porcentaje de espermatozoides móviles en el ratón. Para ello, crearon microambientes celulares con diferentes concentraciones de enzima APN (añadiendo APN recombinante) que hizo que aumentara significativamente esta actividad y vieron que este aumento podía generar consecuencias adversas relacionadas con la fertilidad masculina y con el desarrollo embrionario temprano.

En el citado estudio se demostró en ratones, que el aumento de citotoxicidad mediado por APN recombinante puede causar un daño persistente a los espermatozoides lo cual, si bien no impide la fecundación del ovocito, posteriormente dificulta que el embrión se desarrolle, llegando a la conclusión de que una alta actividad APN tiene un efecto inhibitorio significativo en el desarrollo embrionario temprano, pero no sobre la fecundación. Esto es coincidente con los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde no observamos una relación significativa entre la actividad enzimática de la APN y la tasa de fecundación, pero sí en la calidad embrionaria. Aquellas muestras con mayor actividad APN en líquido seminal generaron embriones con menor número de células, peor simetría y mayor fragmentación en los días 2 y 3 de desarrollo.

Por otra parte, también observamos correlaciones entre la actividad enzimática APN en la fracción de prostasomas. Los prostasomas son vesículas membranosas que están presentes en el semen humano y son secretadas por la glándula prostática. Los prostasomas mejoran la movilidad de los espermatozoides eyaculados y están involucrados en una serie de funciones biológicas adicionales. Estas vesículas se fusionan de manera espontánea con la membrana espermática a un pH ligeramente ácido, transfiriendo moléculas como lípidos y proteínas, entre las cuales se encuentra la APN (Arienti y cols., 1997b). Las correlaciones que se observaron en esta fracción seminal fueron positivas con el número de células y con el porcentaje de fragmentación en día 2 de desarrollo. Este hecho se podría relacionar con una mala calidad embrionaria temprana, como se observaba en la fracción de líquido seminal.

## Discusión

Un resultado interesante observado en este trabajo relacionando con la enzima APN es que una mayor actividad de esta enzima en la fracción de líquido seminal se relaciona con un mayor porcentaje de implantación. Para que el proceso de implantación se desarrolle de manera correcta, se necesitan múltiples interacciones entre el endometrio y el blastocisto humano. Son numerosas las moléculas expresadas en las células epiteliales endometriales durante la ventana de implantación, sin embargo, existe información limitada sobre el mecanismo molecular de dicho diálogo endometrial y embrionario. En los blastocistos, la fibronectina juega un papel importante en la adhesión de varios tipos de células, al unirse a las proteínas de la matriz. En este sentido, hay que destacar que la fibronectina que puede unirse a la APN (Mizutani y cols., 2020; Shimomura y cols., 2006), está presente en las membranas plasmáticas y las membranas lisosomales de las células endometrio. También se sabe que durante la implantación del blastocisto humano se produce una exocitosis de lisosomas a nivel endometrial que transportan diversas peptidasas y nutrientes a la cavidad endometrial para facilitar la implantación del blastocisto (Ruiz-González y cols., 2015). También se ha descrito que la enzima APN se libera en la cavidad uterina debido a el desprendimiento de microvesículas de las células epiteliales endometriales (Ng y cols., 2013; Desrochers y cols., 2016). Recientemente, se ha propuesto que vesículas extracelulares derivadas de células endometriales actúan sobre las células del trofoectodermo para promover la implantación (Mathieu y cols., 2019). Con toda la evidencia de la implicación de las peptidasas a nivel endometrial, también se ha visto que una mayor actividad enzimática APN y DPP IV en el microambiente uterino tiene relación directa con una mejor implantación embrionaria (Yoshihara y cols., 2021).

Al igual que en el caso de la APN, en el caso de la DPP IV también está descrito que es transferida de los prostasomas a los espermatozoides (Arienti y cols., 1997b), aunque como ya hemos explicado, en nuestro estudio detectamos la actividad en la membrana de los espermatozoides del eyaculado. Vistos los datos en conjunto, la actividad DPP IV podría ser un indicador de mala calidad embrionaria en día 3 de desarrollo, no así en día 2.

Como en el caso de la APN y la DPP IV, una mayor actividad de PEP en la fracción de espermatozoides esta asociada a indicadores de una peor calidad de los embriones. En este caso embriones con peor simetría en día 2 y una mayor multinucleación en embriones en día 3 de desarrollo.

Existen estudios que indican que esta enzima es necesaria para una función reproductiva correcta y que su ausencia conduce a alteraciones de las gónadas y, en última instancia, de los gametos. Dotolo y colaboradores (2016) examinaron la distribución de la enzima PEP en células germinales masculinas y estudiaron los efectos de su supresión en testículos y espermatozoides de ratones adultos. Observaron que el recuento total, la motilidad y la morfología normal de los espermatozoides son más elevados en los ratones en los que no se había suprimido esta enzima. Estos resultados muestran por primera vez que la expresión de PEP podría ser necesaria para una función reproductiva correcta. Por otro lado, otros estudios demostraron que con la inhibición de esta actividad se bloqueaba con éxito la translocación de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y de esta manera promovieron la supervivencia de las células, evitando la muerte celular (Matsuda y cols., 2013). Como ya se ha descrito, una mayor actividad de la PEP está relacionada con la muerte celular de los espermatozoides y la necrozoospermia (Valdivia y cols., 2004).

En el caso de la enzima NEP, observamos que mayores niveles de actividad en la fracción de prostasomas están relacionados con unos peores indicadores de calidad embrionaria. Teniendo en cuenta el papel de esta enzima en la degradación de las encefalinas (opioides endógenos) así como en la interconversión de péptidos del Sistema Renina Angiotensina, parece reforzar la idea de que estos sistemas de comunicación celular juegan un papel de cierta relevancia en el desarrollo embrionario temprano.

Observando en conjunto los resultados asociados a las péptidasas de este trabajo, nos sugieren, que una elevada actividad de dichas enzimas en el semen puede ser pronostico de una mala calidad embrionaria. Una posible explicación a este hecho podría ser el aumento en la toxicidad celular, asociada a la elevada actividad peptidásica, esto puede causar un daño en

## Discusión

ADN y estrés oxidativo en los espermatozoides, afectando posteriormente su motilidad (Oluwakemi y cols., 2016). Además, la calidad del ADN del espermatozoide también tiene una influencia directa en el desarrollo del embrión humano (Simon y cols., 2014,2017; Ni y cols., 2014). En cualquier caso, serían necesarios estudios específicos para formular conclusiones más sólidas en este aspecto. La alteración funcional de estos sistemas peptídicos puede afectar a varios procesos biológicos, como la respuesta al estrés oxidativo, la progresión del ciclo celular, la señalización transmembrana y la integridad del ADN, lo que finalmente da como resultado una mayor predisposición hacia condiciones patológicas (Khatun y cols.,2017). Por lo tanto, la exposición de los espermatozoides a niveles elevados de peptidasas puede alterar la homeostasis celular y, posteriormente, dar lugar a consecuencias adversas en el desarrollo.

Finalmente, se puede concluir a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, que las actividades de las enzimas estudiadas podrían ser utilizadas como predictores de la calidad seminal y embrionaria. Para ello, sería necesario establecer unos valores de referencia de cada una de estas actividades, lo cual requeriría de estudios de estas actividades enzimáticas seminales en poblaciones mayores. Si esto se lograra, proporcionaría un método económico, rápido y sencillo de cuantificar, que ayudaría en la toma de decisiones al personal sanitario en las terapias de reproducción asistida.

## **VI. Conclusiones**



## CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos, se ha llegado a las siguientes conclusiones.

- 1.-** La actividad DPP IV está presente en los espermatozoides humanos en el eyaculado, antes de la interacción con los prostasomas en el tracto femenino.
- 2.-** Las muestras seminales con mayor actividad APN en la fracción de líquido seminal presentan una peor calidad según los parámetros de referencia propuestos por la OMS. Igualmente, mayores niveles de actividad DPP IV en las fracciones seminales de prostasomas y espermatozoides presentan peores indicadores de calidad seminal.
- 3.-** Los niveles de actividad de la enzima NEP en la membrana espermática están significativa e inversamente relacionados con la tasa de fecundación.
- 4.-** Una mayor actividad de la enzima APN en las fracciones de líquido seminal y prostasomas se relaciona con una peor calidad embrionaria temprana en base al número de células, porcentaje de fragmentación y grado de simetría.
- 5.-** Una mayor actividad DPP IV en las fracciones de espermatozoides y líquido seminal se relaciona con una peor calidad embrionaria temprana en base al número de células y porcentaje de multinucleación.
- 6.-** Mayores niveles de actividad de la enzima PEP en las fracciones de espermatozoides y líquido seminal se correlaciona con una peor simetría y mayor multinucleación, indicadores de una peor calidad embrionaria.
- 7.-** Existe una correlación negativa entre la actividad enzimática NEP en la fracción de prostasomas y el porcentaje de fragmentación y grado de simetría embrionaria.



## **VII. Bibliografía**



## A

- Abbott CA**, McCaughan GW, Gorrell MD. 1999. Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted beta propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity. *FEBS Letters* 458(3):278-284.
- Agarwal A**, Sharma RK, Nallella KP et al. 2006. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and Sterility* 86:878-885.
- Agerholm IE**, Hnida C, Crüger DG, Berg C, Bruun-Petersen G, Kølvrå S, Ziebe S. 2008. Nuclei size in relation to nuclear status and aneuploidy rate for 13 chromosomes in donated four cells embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 25(2-3):95-102.
- Agirregoitia E**, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subirán N, Ochoa C, Irazusta J. 2006. Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(12):4969-4975.
- Agirregoitia E**, Subirán N, Valdivia A, Gil J, Zubero J, Irazusta J. 2012. Regulation of human sperm motility by opioid receptors. *Andrology* 44:578-585.
- Agirregotia N**, Irazusta A, Ruiz F, Irazusta J, Gil J. 2003. Ontogeny of soluble and particulate prolyl endopeptidase activity in several areas of the rat brain and in the pituitary gland. *Developmental Neuroscience* 25:316-323.
- Ahlström A**, Westin C, Reismer E, Wikland M, Hardarson T. 2011. Trophoctoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Human Reproduction* 26(12):3289-3296.
- Alamá P**, Remohí JA. 2011. Análisis de la Evolución de los Estudios y Tratamientos de la Infertilidad. Matorras R, Coroleu B, Romeu A, Perez F. Libro Blanco Sociosanitario. "La infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas". Imago Concept and Image Development, S.L., Madrid, pp. 43-52.
- Albrizio M**, Guaricci AC, Calamita G, Zarrilli A, Minoia P. 2006. Expression and immunolocalization of the mu-opioid receptor in human sperm cells. *Fertility and Sterility* 86(6):1776-1779.
- Alikani M**, Cohen J. 1995. Patterns of the cell fragmentation in the human embryo. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 3:283-288.

## Bibliografía

- Alikani M**, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott R. 1999. Human embryo fragmentation in vitro and its implication for pregnancy and implantation. *Fertility and Sterility* 71:836-842.
- Alikani M**, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. 2000. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Human Reproduction* 15:2634-2643.
- Alpha Scientist in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology**. 2011. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* 26:1270-1283.
- Alpha Scientist in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology**. 2011. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reproductive Biomedicine Online* 22:632-646.
- An T**, Wang YF, Liu JX, Pan YY, Liu YF, He ZC, Mo FF, Li J, Kang LH, Gu YJ. 2018. Comparative analysis of proteomes between diabetic and normal human sperm: Insights into the effects of diabetes on male reproduction based on the regulation of mitochondria-related proteins. *Molecular Reproduction and Development* 85:7-16.
- Andersen E**, Juhl CR, Kjølner ET, Lundgren JR, Janus C, Dehestani Y, Saupstad M, Ingerslev LR, Duun OM, Jensen SBK, Holst JJ, Stallknecht BM, Madsbad S, Torekov SS, 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. *Human Reproduction* 37(7):1414-1422.
- Ansorge S**, Reinhold D. 2006. Immune peptides related to dipeptidyl aminopeptidase IV/CD26. En: *Handbook of biologically active peptides*. Kastin AJ (Eds.). Elsevier Academic Press. pp. 567-572.
- Antczak M**, Van Blerkom J. 1999. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Human Reproduction* 14(2):429-447.
- Antczak C**, De Meester I, Bauvois B. 2001. Ecto-peptidases in pathophysiology. *Bioessays* 23:251-260.
- Aparicio Prieto MV**, Rodríguez Gallego MV, Valdivia Palacín A, Franco Iriarte Y, Hervás Barbara G, Echevarría Orella E, Casis Saenz L. 2022. Local renin angiotensin system and sperm DNA fragmentation. *Asian Journal of Andrology* 24(2):139-146.

**Ardoy M**, Calderón G. 2008. Criterios ASEBIR de la valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Cuadernos de Embriología Clínica. Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción

**Arienti G**, Polci A, Carlini E, Palmerini CA. 1997a. Transfer of CD26/dipeptidyl peptidase IV (E.C. 3.5.4.4) from prostasomes to sperm. FEBS Letters 410(2-3):343-346.

**Arienti G**, Carlini E, Verdacchi R, Cosmi EV, Palmerini CA. 1997b. Prostate to sperm transfer of CD13/aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). Biochimica et Biophysica Acta 1336:533-538.

**Atlas SA**. 2007. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. Journal Managed Care Pharmacy 13:9-20.

## B

**Balasz J**, Miro F, Burzaco I, Casamitjana R, Civico S, Ballesca JL, Puerto B, Vanrell JA. 1995. The role of luteinizing-hormone in human follicle development and oocyte fertility - Evidence from in vitro fertilization in a woman with long standing hypogonadotropic hypogonadism and using recombinant human follicle stimulation hormone. Human Reproduction 10(7):1678-1683.

**Balakier H**, Cadesky K. 1997. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. Human Reproduction 12(4):800-804.

**Balasz J**. 2008. Edad y Reproducción: aspectos epidemiológicos y generales.

**Balogh A**, Cadel S, Foulon T, Picart R, Der garabedian A, Rousselet A, Tougard C, Cohen P. 1998. Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. Journal of Cell Science 111:161-169.

**Barrett AJ**, Rawlings ND, Woessner JF. 2004. Handbook of Proteolytic Enzymes. (Eds.). 2ª Edición. Vol. 1. Elsevier Academic Press.

**Barroso G**, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendano C, Oehninger S. 2009. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. Fertility and Sterility 92:835-848.

**Bedford J. M.** 1983. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. Biology of Reproduction 28(1):108-120.

## Bibliografía

- Behr B**, Pool TB, Milki AA, Moore D, Gebhardt J, Dasig D. 1999. Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. *Human Reproduction* 14(2):454-457.
- Bernardini LM**, Calogero AE, Bottazzi C, Lanteri S, Luigi Venturini P, Burrello N, De Plama A, Conte N, Ragni N. 2005. Low total normal motile count values are associated with increased sperm disomy and diploidy rates in infertile patients *International Journal of Andrology* 28:328-336.
- Bianchi L**, Gagliardi A, Campanella G, Landi C, Capaldo A, Carleo A, Armini A, De Leo V, Piomboni P, Focarelli R, Bini L. 2013. A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid en route for oocyte quality evaluation. *Journal of Proteomics* 90:61-76.
- Bickel M**, Tan JSE, Taubert HD, Kuhl H. 1972. Evidence of a sex-specific effect of testosterone and progesterone upon L-cystine-aminopeptidase activity in hypothalamus and paleopallium of rat. *Neuroendocrinology* 9(6):321-331.
- Bischof P**, Campana A 1996. A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Human Reproduction* 2(3):262-270.
- Blake M**, Garrisi J, Tomkin G, Cohen J. 2000. Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertility and Sterility* 73:31-37.
- Blanco L**, Pérez I, Sanz B, Gil J, Lopez JI, Ugalde A, Varona A, Larrinaga G. 2010. Changes in cell-surface peptidase activity in papillary renal cell carcinoma. *Anticancer Research* 30(4):1137-1141.
- Blanco L**. 2010. Alteraciones en la actividad enzimática, expresión tisular y expresión génica de peptidasas en neoplasias renales. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco/Eukal Herriko Unibersitatea. Tesis doctoral.
- Bolle P**, Evandri MG, Saso L. 2002. The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception* 65:313-315.
- Bonilla-Musoles F**. 2010. La realidad es más tozuda que la ficción. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 27(1):1-3.
- Bosler J. S**, Davies K. P, Neal-Perry, G. S. 2014. Peptides in seminal fluid and their role in infertility: a potential role for opiorphin inhibition of neutral endopeptidase activity as a clinically relevant modulator of sperm motility: a review. *Reproductive Sciences* 21(11):1334-1340.

**Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramo of proteína utilizing the principle of proteína-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

**Braundmeier AG,** Miller DJ. 2001. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *Journal of Dairy Science* 84:1915-1925.

**Browder L,** Erickson CA, Jeffery WR. 1991. *Developmental Biology*, 3. argitalpena. Saunders College Publishing. New York.

**Bruna I,** Bethencourt J, Herrero J. 2008. *Curso de Reproducción Asistida. Estudio de la pareja estéril (protocolo básico)*. Merck Serono.

## C

**Carrera MP,** Ramirez-Expósito MJ, Garcia MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM. 2009. Ovarian Renin-Angiotensin System-regulating aminopeptidases are involved in progesterone overproduction in rats with mammary tumours induced by N-Methyl nitrosourea. *Anticancer Research* 29(11):4633-4637.

**Carl-McGrath S,** Lendeckel U, Ebert M, Röcken C. 2006. Ectopeptidases in tumour biology: a review. *Histology and Histopathology* 21:1339-1353.

**Carlsson L,** Ronquist G, Eliasson R, Egberg N, Larsson A. 2006. Flow cytometric technique for determination of prostasomal quantity, size and expression of CD10, CD13, CD26 and CD59 in human seminal plasma. *International Journal of Andrology* 29:331-338.

**Chemes HE,** Alvarez Sedo C. 2012. Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian Journal of Andrology* 14(1):14-23.

**Chen YP,** Li J, Wang ZN, Reichetzeder C, Xu H, Gong J, Chen GJ, Pfab T, Xiao XM, Hoher B. 2012. Renin angiotensin aldosterone system and glycemia in pregnancy. *Clinical Laboratory* 58:527-533.

**Chen FX,** Wan Q, Li QL, Fang J, Peng L, Hu J. 2022. Substance P prevents doxorubicin induced cardiomyocyte injury by regulating apoptosis and autophagy: *In vitro* and *in vivo* evidence. *Molecular Medicine Reports* 25(2):50.

## Bibliografía

- Cicero TJ**, Davis LA, LaRegina MC, Meyer ER, Schlegel MS. 2002. Chronic opiate exposure in the male rat adversely affects fertility. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 72:157-163.
- Clermont Y**. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammal: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews* 52:198-236.
- Collins JA**. 2004. Evidence-based infertility: evaluation of the female partner. *International Congress Series* 1266:57-62.
- Cosentino MJ**, Cockett AT. 1986. Structure and function of the epididymis. *Urology Ressearch* 14(5):229-240.
- Cross NL**. 1996. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biology of Reproduction* 54(1):138-145.
- Cuadros M**, Andrés Criado L, Sanchez de Burgos M, Morales Morales M, Ricciarelli E, Gomez Palomares JL. 2011. Analisis comparativo de las tasas de implantación de embriones mononucleados y embriones multinucleados em D+2. *Revista Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción* 16:168.
- D**
- Dabbagh Rezaeiye R**, Mehrara A, Mohammad Ali Pour A, Fallahi J, Forouhari S. 2022. Impact of various parameters as predictors of the success rate of *In Vitro* fertilization. *International Journal of Fertility and Sterility* 16(2):76-84.
- Daffre S**, Bulet P, Spinsi A Ehret-Sabater L, Rodrigues EG, Travassos LR. 2008. Bioactive natural peptides. *Studies in natural products chemistry*. Atta-ur-Rahman (Eds.) Elsevier. pp. 597-691.
- Daneshjou D**, Zadeh Modarres S, Soleimani Mehranjani M, Shariat Zadeh SMA. 2021. Comparing the effect of sitagliptin and metformin on the oocyte and embryo quality in classic PCOS patients undergoing ICSI. *Irish Journal of Medical Science* 190(2):685-692.
- Daniell HW**. 2002. Hypogonadism in men consuming sustained-action oral opioids. *Journal of Pain* 3:377-384.

- De Gandarias JM**, Ramirez M, Zulaica J, Casis L. 1989. Aminopeptidase (Arylamidase) activity in discrete areas of the rat-brain: Sex differences. *Hormone and Metabolic Research* 21(5):285-286.
- De Gandarias JM**, Ramirez M, Echevarria E, Irazusta J, Casis L. 1990. Serum and brain aminopeptidase activities in cyclic rats. *General Physiology and Biophysics* 9(4):385-389.
- De Gandarias JM**, Irazusta J, Gil J, Fernández D, Casis L. 1993. Brain soluble and membrane-bound Tyr-aminopeptidase activities during the stages of estrous and proestrous in the female rat. *Brain Research* 620:146-148.
- De Gandarias JM**, Irazusta J, Fernández D, Varona A, Casis L. 1994. Developmental changes of pyroglutamate-peptidase I activity in several regions of the female and the male rat brain. *The International Journal of Neuroscience* 77(1-2):53-60.
- De Gandarias JM**, Irazusta J, Fernández D, Gallego M, Silió M, Casis L. 1996. Membrane-bound tyrosine aminopeptidase activities in the rat brain throughout the estrous cycle. *Life Sciences* 59:1097-101.
- De Gandarias JM**, Irazusta J, Varona A, Gil J, Fernández D, Casis L. 1999a. Effect of imipramine on enkephalin-degrading peptidases. *European Neuropsychopharmacology* 9(6):493-499.
- De Gandarias JM**, Astiazaran JI, Varona A, Fernández D, Gil J, Casis L. 1999b. Effect of lithium treatments on the tyrosine-aminopeptidase activities in the rat brain and the pituitary gland. *Arzneimittel-Forschung-Drug Research* 49(10):816-819.
- Dell'Aquila ME**, Casavola V, Reshkin SJ, Albrizio M, Guerra L, Maritato F, Minoia P. 2002. Effects of beta-endorphin and Naloxone on in vitro maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 63(2):210-222.
- Dellenbach P**, Nisand I, Moreau L et al. 1984. Transvaginal sonographically controlled ovarian follicle punctura for egg retrieval. *Lancet* 1:1467
- Denker HW**. 1993. Implantation: a cell biological paradox. *Journal of Experimental Zoology* 266:541-558.
- De Placido G**, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B. 2002. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Human Reproduction* 17(9):2402-2409.

## Bibliografía

**Desay NM**, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. 2000. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Human Reproduction* 15:2190-2196.

**Desrochers LM**, Bordeleau F, Reinhart-King CA, Cerione RA, Antonyak MA. 2016. Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation. *Nature Communications* 7:11958.

**Dobson H**, Smith RF. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science* 60:743-752.

**Dohle GR**, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. 2005. Working Group on Male Infertility. EAU guidelines on male infertility. *European Urology* 48:703-711.

**Dotolo R**, Kim JD, Pariante P, Minucci S, Diano S. 2016. Prolyl endopeptidase (PREP) is associated with male reproductive functions and gamete physiology in mice. *Journal of Cellular Physiology* 231(3):551-557.

**Drucker DJ**, Nauck MA. 2006. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4-inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368:1696-1705.

**Dudeck WR**, Fix JD. 2004. *High-Yield (Embryology) 3*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.

## E

**Edwards RG**, Beard HK. 1997. Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Molecular Human Reproduction* 3:863-905.

**Elder K**, Cohen J. 2007. *Human preimplantation embryo selection*. Londres: Taylor-Francis.

**Ellis RE**, Kimble J. 1994. Control of germ cell differentiation in *Caenorhabditis elegans*. *Ciba Foundation Symposium* 182:179-188.

**ESHRE 2022**. [HTTPS://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/ART-fact-sheet.aspx](https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/ART-fact-sheet.aspx).

**Eppig JJ**. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122(6):829-838.

**Erbeznik H**, Hersh LB. 1997. A novel mammalian high-molecular-weight aminopeptidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344(1):228-234.

**Evenson D**, Wixon R. 2006. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive BioMedicine Online* 12:466-472.

## F

**Fabbri A**, Jannini EA, Gnessi L, Ulisse S, Moretti C, Isidori A. 1989. Neuroendocrine control of male reproductive function: The opioid system as a model of control at multiple sites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 32(1B):145-150.

**Fainberg J**, Kashanian JA. 2019. Recent advances in understanding and managing male infertility. *Faculty Reviews-F1000 Research* 670:16-18.

**Fauque P**, Audureau E, Leandri R, Delaroche L, Assouline S, Epelboin S, Jouannet P, Patrat C. 2013. Is the nuclear status of an embryo an independent factor to predict its ability to develop to term?. *Fertility and Sterility* 99(5):1299-1304.

**Fernández D**, Valdivia A, Irazusta J, Ochoa C, Casis L. 2002. Peptidase activities in human semen. *Peptides* 23(3):461-468.

**Finn CA**. 1986. Implantation, menstruation and inflammation. *Biological Reviews* 61:312-328.

**Finn A**, Scott L, O'Leary T, Davies D, Hill J. 2010. Sequential embryo scoring as a predictor of aneuploidy in poor-prognosis patients. *Reproductive Biomedicine Online* 21:381-390.

**Fleming TP**, Ghassemifar MR, Sheth B. 2000. Junctional complexes in the early mammalian embryo. *Seminars in Reproductive Medicine* 18:185-193.

**Flesch FM**, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica Biophysica Acta* 1469(3):197-235.

**Fraser LR**. 2008. The role of small molecules in sperm capacitation. *Theriogenology* 70(8):1356-1359.

**Fritz R**, Mukherjee A, Zaghi S, Agalliu I, Jindal S, Tashima AK, Fricker LD, Davies KP. 2019. Identification and characterization of RSIY-11, a novel seminal peptide derived from semenogelin-1, which acts as a neutral endopeptidase inhibitor modulating sperm motility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 36(9):1891-1900.

**Fujisawa M**, Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. 1996. Metenkephalin in seminal plasma of infertile men. *International Journal of Urology* 3(4):297-300.

## Bibliografía

**Fujiwara H**, Imai K, Inoue T, Maeda M, Fujii S. 1999. Membrane-bound cell surface peptidases in reproductive organs. *Endocrine Journal* 46(1):11-25.

**Fujiwara H**. 2004. Functional roles of cell surface peptidases in reproductive organs. *Reproductive Medical and Biology* 3(4):165-176.

**Fyhrquist F**, Saijonmaa O. 2008. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine* 264:224-236.

## G

**García-Herrero S**, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M. 2011. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reproductive Biomedicine Online* 22(1):25-36.

**García-Hornsman JA**, Männistö PT, Venäläinen JI. 2007. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* 41:1-24.

**Gardner RL**, Schoolcraft WB. 1990. In Vitro culture of human blastocysts. En: Cabinsen R, Morimer D, editors. *Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond*. Carnforth: The Parthenon Publishing Group Inc. pp.378-388.

**Gardner DK**, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. 1998. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and Sterility* 69(1):84-88.

**Garrido N**, Meseguer M, Simon C et al. 2004. Pro-oxidative and antioxidative imbalance in human semen and its relation with male. *Fertility Asian Journal of Andrology* 6:59-65.

**Garrido N**, Remohí J, Martínez-Conejero JA, García-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M. 2008. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reproductive Biomedicine Online* 17(6):855-865.

**Gass J**, Khosla C. 2007. Prolyl endopeptidases. *Biomedicine & Diseases: Review. Cellular and Molecular Life Sciences* 64:345-355.

**Gatti JL**, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Metayer S, Thimon V, Dacheux JL. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science* 82-83:321-339.

- Gawecka JE**, Marh J, Ortega M, Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS. 2013. Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. *PLoS One* 8:e56385.
- Gerris J**, De Neubourg D, Mangelschots K, Van Royen E, Van de Meerssche M, Valkenburg M. 1999. Prevention of twin pregnancy after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Human Reproduction* 14:2581-2587.
- Gianzo M**, Munoa-Hoyos I, Urizar-Arenaza I, Larreategui Z, Quintana F, Garrido N, Subiran N, Irazusta J. 2016. Angiotensin II type 2 receptor is expressed in human sperm cells and is involved in sperm motility. *Fertility and Sterility* 105:608-616.
- Gianzo M**, Urizar-Arenaza I, Muñoa-Hoyos I, Larreategui Z, Garrido N, Casis L, Irazusta J, Subiran N. 2018. Human sperm testicular angiotensin-converting enzyme helps determine human embryo quality. *Asian Journal of Andrology* 20:498-504.
- Gianzo M**, Subirán N. 2020. Regulation of male fertility by the renin-angiotensin system. *International Journal of Molecular Sciences* 21:7943.
- Gianzo M**, Urizar-Arenaza I, Muñoa-Hoyos I, Labaka G, Larreategui Z, Garrido N, Irazusta J, Subirán N. 2022. Sperm aminopeptidase N identifies the potential for high-quality blastocysts and viable embryos in oocyte-donation cycles. *Human Reproduction* 37(10):2246-2254.
- Gil JG**, Larrinaga JJ, Meana R, Rodriguez-Puertas J, Irazusta L, Casis. 2001. Regional and subcellular distribution of soluble aminopeptidases in the human and the rat brain: a comparative study. *Neuropeptides* 35:276-284.
- Gilchrist RB**, Ritter LJ, Armstrong DT. 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 82-3:431-446.
- Gleicher N**, Friberg J, Fullan N, Giglia RV, Mayden K, Kesky T, Siegel I 1983. ECG retrieval for in vitro fertilisation by sonographically controlled vaginal culdocentesis. *Lancet* 2:508-509.
- Glujovsky D**, Blake D, Farquhar C, Bardach A. 2012. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 11(7):CD002118.

## Bibliografía

**González R**, Quintana J, Campos I, Magán R, Ballesteros A. 2007. Estudio de la mujer estéril. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. J. Remohí, J. Bellver, J. Domingo, E. Bosch and A. Pellicer, McGraw-Hill pp.1-9.

**Goossens F**, Wauters JG, Vanhoof GC, Bossuyt PJ, Schatteman KA, Loens K, Scharpé SL. 1996a. Subregional mapping of the human lymphocyte prolyl oligopeptidase gene (PREP) to human chromosome 6q22. *Cytogenetics and Cell Genetics* 74:99-101.

**Goossens F**, De Meester I, Vanhoof G, Scharpé S. 1996b. Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 34:17-22.

**Gotoh H**, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. 1988. Activity of dipeptidyl peptidase IV and post-proline cleaving enzyme in sera from osteoporotic patients. *Clinical Chemistry* 34:2499-501.

**Govindaraju A**, Dogan S, Rodriguez-Osorio N, Grant K, Kaya A, Memili E. 2012. Delivering value from sperm proteomics for fertility. *Cell and Tissue Research* 349:783-793.

**Gratzke C**, Angulo J, Chitale K, Dai YT, Kim NN, Paick JS, Simonsen U, Uckert S, Wespes E, Andersson KE, Lue TF, Stief CG. 2010. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *Journal of Sexual Medicine* 7:445-475.

**Grifo JA**, Boyle A, Fischer E, Lavy G, DeCherney AH, Ward DC, Sanyal MK. 1990. Preembryo biopsy and analysis of blastomeres by in situ hybridization. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 163(6):2013-2019.

**Gross C**, Giros B, Schwartz JC. 1985. Identification of aminopeptidase M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membranes. *Biochemistry* 24:2179-2185.

**Guyton AC**, Hall JE. 2021. *Compendio de fisiología médica*, 14ª Edición Elsevier. Madrid.

**Guzick DS**, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL; National Cooperative Reproductive Medicine Network. 2001. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New England Journal of Medicine* 345(19):1388-1393.

## H

**Hallberg M**, Le Grevès P, Nyberg F. 2005. Neuropeptide processing. En: *Proteases in the Brain*. Lendeckel NM y Hooper U (Eds.). Springer Science pp.203-234.

- Harata T**, Ando H, Iwase A, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F. 2006. Localization of angiotensin II, the AT1 receptor, angiotensin-converting enzyme, aminopeptidase A, adipocyte-derived leucine aminopeptidase, and vascular endothelial growth factor in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Fertility and Sterility* 86(2):433-439.
- Hardarson T**, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. 2001. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Human Reproduction* 16:313-318.
- Harrison RAP**. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development* 8(4):581-594.
- Hannoun A**, Ghaziri G, Abu Musa A, Zreik TG, Hajameh F, Awwad J. 2010. Addition of sphingosine-1-phosphate to human oocyte culture medium decreases embryo fragmentation. *Reproductive Biomedicine Online* 20(3):328-334.
- Havre PA**, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. 2008. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Frontiers in Bioscience* 13:1634-1645.
- Hernández-Vargas P**, Muñoz M, Domínguez F 2020. Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes. *Human Reproduction Update* 26(2):264-301.
- Herr D**, Bekes I, Wulf C. 2013. Local Renin-Angiotensin system in the reproductive system. *Frontiers in Endocrinology* 4:150.
- Hnida C**, Engenheiro E, Ziebe S. 2004. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Human Reproduction* 19(2):288-293.
- Hill MJ**, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, Browne PE, Levens ED. 2013. Trophoctoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertility and Sterility* 99(5):1283-1289.e1.
- Hirano Y**, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I. 2001. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates *in vitro*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 18:213-218.

## Bibliografía

**Holte J**, Berglund L, Milton K, Garello C, Gennarelli G, Revelli A, Bergh T. 2007. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Human Reproduction* 22(2):548-557.

**Hooper NM**. 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Letters* 354:1-6.

**Hui KS**. 2007. Brain-specific aminopeptidase: from enkephalins to protector against neurodegeneration. *Neurochemical Research* 32:2062-2071.

## I

**Irazusta J**, Valdivia A, Fernández D, Agirregoitia E, Ochoa E, Ochoa C, Casis L. 2004. Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *Journal of Andrology* 25:733-739.

**Ito K**, Kitazono AA, Yoshimoto T. 2004. Prolyl oligopeptidase. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Barrett AJ, Rawlings ND y Woessner JE (Eds.). 2ª Edición. Vol. 2. Elsevier Academic Press. pp.1897-1900.

**Iwaki-Egawa S**, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y. 1998. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization and N-terminal amino acid sequence. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 124:428-433.

## J

**Jackson KV**, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. 1998. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility* 70(1):60-66.

**Janny L**, Menezo YJ. 1994. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Molecular Reproduction and Development* 38:36-42.

**Jequier AM**, Crich J. *Semen analysis: a practical guide*. Blackwell Scientific publications, Oxford.

- Jiang L**, Quian Y, Chen X, Ji X, Ou S, Li R, Yang D, Li Y. 2021. Effect of early rescue ICSI and split IVF-ICSI in preventing low fertilization rate during the first ART cycle: A real-world retrospective cohort study. *Reproductive Medicine and Biology* 21(1):e122420.
- Joris H**, Nagy Z, Van de Velde H, De vos A, Van Steirteghem A. 1998. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Human Reproduction* 13:76-86.
- Juneja SC**, Pfeifer TL, Tang XM, Williams RS, Chegini N. 1995. Modulation of mouse sperm-egg interaction, early embryonic development and trophoblastic outgrowth by activated and unactivated macrophages. *Endocrine* 3:69-79.
- Jung K**, Pergande M, Wischke UW. 1984. Characterization of particulate and soluble variants of the brush-border enzymes alanine aminopeptidase, alkaline-phosphatase and gamma-glutamyltransferase in human-urine. *Biomedica Biochimica Acta* 43(12):1357-64.
- Jungwirth A**, Giwercman A, Tournaye H. 2012. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European Urology*. pp. 324-332.
- Juriscova A**, Varmuza S, Casper RF. 1995. Involvement of programmed cell death in preimplantation embryo demise. *Human Reproduction Update* 1:558-566.
- Juriscova A**, Varmuza S, Casper RF. 1996. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Molecular of Human Reproduction* 2:93-98.
- Juyena NS**, Stelletta C. 2012. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology* 33:536-551.

## K

- Kaminski T**, Siawrys G, Bogacka I, Okrasa S, Przala J. 2003. The regulation of steroidogenesis by opioid peptides in porcine theca cells. *Animal Reproduction Science* 78(1-2):71-84.
- Karlsson C**, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS, Carlsson B. 1997. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82(12):4144-4148.
- Katz N**, Mazer NA. 2009. The impact of opioids on the endocrine system. *Clinical Journal of Pain* 25:170-175.

## Bibliografía

- Kerr MA**, Kenny AJ. 1974a. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochemical Journal* 137:477-488.
- Kerr MA**, Kenny AJ. 1974b. The molecular weight and properties of a neutral metalloendopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochemical Journal* 137:489-495.
- Khatun A**, Rahman MS, Ryu DY, Kwon WS, Pang MG. 2017. Elevated aminopeptidase N affects sperm motility and early embryo development. *PLoS One* 12:e0184294.
- Khatun A**, Kang KH, Ryu DY, Rahman MS, Kwon WS, Pang MG. 2018. Effect of Aminopeptidase N on functions and fertility of mouse spermatozoa in vitro. *Theriogenology* 118:182-189.
- Khorram O**, Patrizio P, Wang C, Swerdloff R. 2001. Reproductive technologies for male infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(6):2373-2379.
- Kierszenbaum AL** y Tres L. 2012. *Histología y Biología Celular. Introducción a la Anatomía Patológica* 3ª Edición. Elsevier. Barcelona.
- Kikkawa F**, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Nomura S, Mizutani S. 2005. Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751:45-51.
- Kimura A**, Matsui H, Takahashi T. 2002. Expression and localization of prolyl oligopeptidase in mouse testis and its possible involvement in sperm motility. *Zoological Science* 19(1):93-102.
- Kovacic B**, Vlaisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. 2004. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reproductive Biomedicine Online* 8(6):687-694.
- Kruse TA**, Bolund L, Grzeschik KH, Ropers HH, Olsen J, Sjöström H, Norén O. 1988. Assignment of the human aminopeptidase N (peptidase E) gene to chromosome 15q13-qter. *FEBS Letters* 239:305-308.
- Krüssel JS**, Bielfeld P, Polan ML, Simón C. 2003. Regulation of embryonic Implantation. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 110:2-9.
- Kumar R**, Gautam G, Gupta NP. 2006 Drug therapy for idiopathic male infertility: rationale versus evidence. *The Journal of Urology* 176:1307-1312.

**Kuhl H**, Taubert HD. 1975. Short-loop feedback mechanism of luteinizing-hormone: LH stimulates hypothalamic L-cystine arylamidase to inactivate LH-RH in rat hypothalamus. *Acta Endocrinologica* 78(4):649-663.

## L

**Larrinaga G**, Callado LF, Agirregoitia N, Varona A, Gil J. 2005. Subcellular distribution of membrane-bound aminopeptidases in the human and rat brain. *Neuroscience Letters* 383:136-140.

**Larrinaga G**, Perez I, Blanco L, López JI, Andrés L, Etxezarraga C, Santaolalla F, Zabala A, Varona A, Irazusta J. 2010. Increased prolyl endopeptidase activity in human neoplasia. *Regulatory Peptides* 163:102-106.

**Larrinaga G**, Pérez I, Sanz B, Zarrazquin I, Casis L, Antonio Anta J, Martinez A, Santaolalla F. 2011a. Altered dipeptidyl peptidase IV and prolyl endopeptidase activities in chronic tonsillitis, tonsillar hyperplasia and adenoid hyperplasia. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 75(3):347-350.

**Larrinaga G**, Pérez I, Sanz B, Irazusta A, Zarrazquin I, Elena Sanchez C, Sanchez del Rey A, Zabala A, Santaolalla F. 2011b. Activity of soluble aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV and membrane-bound aminopeptidase B and pyroglutamyl peptidase I in adenoid hyperplasia, tonsillar hyperplasia and chronic tonsillitis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 75(11):1399-1403.

**Larrinaga G**, Blanco L, Sanz B, Pérez I, Gil J, Unda M, Andres L, Casis L, Lopez JI. 2012. The impact of peptidase activity on clear cell renal cell carcinoma survival. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 303(12):1584-1591.

**Larsen L**, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwercman A. 2000. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction* 15:1562-1567.

**Lasiene K**, Gedrimas V, Vitkus A, Glinskyte S, Lasys V, Valanciute A, Sienkiewicz W. 2013. Evaluation of morphological criteria of sperm quality before in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 16(4):773-785.

**Leung PS**, Sernia C. 2003. The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones. *Journal of Molecular Endocrinology* 30:263-270.

## Bibliografía

- Leung PS.** 2007. Renin-Angiotensin System Proteases and the Cardiometabolic Syndrome: Pathophysiological, Clinical and Therapeutic Implications. En: *Frontiers in research of the renin-angiotensin system on human disease*. Leung PS (Eds.). Springer. Holanda. pp.87-112.
- Levy R,** Eustache F, Pilikian S, Clavel C, Cordonier H, Benchaib M, Lornage J, Pinatel MC, Guerin JF. 1996. Effect of gastrin-releasing peptide on sperm functions. *Molecular Human Redroduction* 2(11):867-872.
- Lewis Se.** 2007. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* 134:31-40.
- Li JR,** Wilk E, Wilk S. 1996. Inhibition of prolyl oligopeptidase by Fmoc-aminoacylpyrrolidine-2-nitriles. *Journal of Neurochemistry* 66(5):2105-2112.
- Liu L,** Qian J, Singh H, Meiers I, Zhou X, Bostwick DG. 2007. Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: an optimal and practical panel for differential diagnosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 131:1290-1207.
- López ME.** 2008. Calidad folicular: Agonistas versus antagonistas de la GnRH en una población de buen pronóstico. Servicio de Obstetricia y Ginecología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Universidad de Granada. Tesis doctoral.

## M

- Magli MC,** Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. 2007. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertility and Sterility* 87(3):534-541.
- Malfroy B,** Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Schofield PR. 1988. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Letters* 229:206-210.
- Mantle D.** 1992. Comparison of soluble aminopeptidases in human cerebral cortex, skeletal muscle and kidney tissues. *Clinica Chimica Acta* 207:107-118.
- Marigomez I,** Cajaraville MP. 1999. Zelula. Udako Euskal Unibertsitatea. Bilbao.
- Marks N,** Datta RK, Lajtha A. 1968a. The relationship of aminotripeptidase and arylamidase to protein breakdown in the brain. En: *Macromolecules and Function of the neurone*. Lodin Z (Eds.). Excerpta Medica.

- Marks N**, Datta RK, Lajtha A. 1968b. Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases. *Journal of Biological Chemistry* 243:2882-2889.
- Marks N**, Estern F, Lajtha A. 1974. Changes of proteolytic enzymes and proteins during maturation of the brain. *Brain Research* 86:307-322.
- Martínez MC**, Bernabe MJ, Gomez E, Ballesteros A, Landeras J, Glover G, Gil-Salom M, Remohi J, Pelicer A. 2000. Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *Journal of Andrology* 21:651-655.
- Maruani P**, Schwartz D. 1983. Sterility and fecundability estimation. *Journal of Theoretical Biology* 105(2):211-219.
- Mascarenhas MN**, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. 2012. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Medicine* 9(12):e1001356.
- Mathieu M**, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. 2019. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology* 21:9-17.
- Matsas R**, Stephenson SL, Hryszko J, Kenny AJ, Turner AJ. 1985. The metabolism of neuropeptides: phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N. *Biochemistry Journal* 231:445-449.
- Matsuda T**, Sakaguchi M, Tanaka S, Yoshimoto T, Takaoka M. 2013. Prolyl oligopeptidase is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-binding protein that regulates genotoxic stress-induced cell death. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45:850-857.
- McDonald JK**, Barret AJ. 1986. *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography*. En: *Exopeptidases*. Vol. 2. Academic Press. pp.59-71.
- McLellan S**, Dyer SH, Rodriguez G, Hersh LB. 1988. Studies on the tissue distribution of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases. *Journal of Neurochemistry* 51:1552-1559.
- Meriano J**, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. 2004. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reproductive Biomedicine Online* 9(5):511-520.

## Bibliografía

- Meseguer M**, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Simon C, Pellicer A, Remohi J. 2004. Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *Journal of Assisted. Reproduction and Genetics* 21:445-451.
- Meseguer M**, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J, Garrido N. 2006 Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertility and Sterility* 86:1376-1385.
- Miller D**, Ostermeier GC. 2006 Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gynecologie Obstetrique Fertilite* 34:840-846.
- Mina-Osorio P**. 2008. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in Molecular Medicine* 14:361-371.
- Minaretzis D**, Harris D, Alper MM, Mortola JF, Berger MJ, Power D. 1998. Multivariate analysis of factors predictive of successful live births in in vitro fertilization (IVF) suggests strategies to improve IVF outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 15(6):365-371.
- Mizutani S**, Matsumoto K, Kato Y, Mizutani E, Mizutani H, Iwase A, Shibata K. 2020. New insights into human endometrial aminopeptidases in both implantation and menstruation. *Biochimica et. Biophysica. Acta Proteins and Proteomics* 1868(2):140332.
- Morain P**, Robin JL, De Nanteuil G, Jochemsen R, Heidet V, Guez D. 2000. Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study. *British Journal of Clinical Pharmacology* 50(4):350-359.
- Morain P**, Boeijinga PH, Demazieres A, De Nanteuil G, Luthringer R. 2007. Psychotropic profile of S 17092, a prolyl endopeptidase inhibitor, using quantitative EEG in young healthy volunteers. *Neuropsychobiology* 55(3-4):176-183.
- Moriwaki T**, Suganuma N, Hayakawa M, Hibi H, Katsumata Y, Oguchi H, Furuhashi M. 2004. Embryo evaluation by analysing blastomere nuclei. *Human Reproduction* 19(1):152-156.
- Mortimer ST**. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update* 3(5):403-439.

- Mortimer ST**, Swan MA, Mortimer D. 1998. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reproduction* 13(8):2139-21146.
- Munkelwitz R**, Gilbert BR. 1998. Are boxer shorts really better? A critical analysis of the role of underwear type in male subfertility. *Journal of Urology* 160(4):1329-1333.
- Munné S** y Cohen J. 1998. Chromosome abnormalities in human embryos. *Human Reproduction Update* 4:842-855.
- Munné S**. 2006. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reproductive Biomedicine Online* 12(2):234-253.
- Murakami H**, Yokoyama A, Kondo K, Nakanishi S, Kohno N, Miyake M. 2005. Circulating aminopeptidase N/CD13 is an independent prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer of Research* 11:8674-8679.
- Muriel L**, Garrido N, Fernandez JL et al. 2006. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 85:371-383.
- Myohanen TT**, Tenorio-Laranga J, Jokinen B, Vazquez-Sanchez R, Moreno-Baylach MJ, Garcia-Horsman JA, Mannisto PT. 2011. Prolyl oligopeptidase induces angiogenesis both in vitro and in vivo in a novel regulatory manner. *British Journal of Pharmacology*. 163(8):1666-1678.
- N**
- Ng YH**, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, Salamonsen LA. 2013. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: A new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS One* 8(3) e58502.
- Nagy ZP**, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, Vankelecom A, Devroey P, Van Steirteghem AC. 1995. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Human Reproduction* 10:3171-3177.
- Nanus DM**. 2003. Of peptides and peptidases: the role of cell surface peptidases in cancer. *Clinical Cancer of Research* 9:6307-6309.

## Bibliografía

**Nemeth G**, Pepperell JR, Yamada Y, Palumbo A, Naftolin F. 1994. The basis and evidence of a role for the ovarian renin-angiotensin system in health and disease. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 1(2):118-127.

**Ni W**, Xiao S, Qiu X, Jin J, Pan C, Li Y. 2014. Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcome of frozen-thawed embryo transfer and on blastocyst formation. *PLoS One* 9:e94956.

**Noble F**, Roques BP. 2007. Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert opinion on therapeutic targets* 11:145-159.

## O

**O'Cuinn G**. 1998. Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells. *Biochemical Society Transactions* 26:279-292.

**Ohsako T**, Shirakami M, Oiwa K, Ibaraki K, Karr T, Tomaru M, Sanuki R, Takano-Shimizu-Kouno T. 2021. The *Drosophila* *Nepriylisin 4* gene is essential for sperm function following sperm transfer to females. *Genes and Genetic Systems* 96(4):177-186.

**Ojosnegros S**, Seriola A, Godeau AL, Veiga A. 2021. Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques. *Human Reproduction Update*. 27(3):501-530.

**O'Leary RM**, Gallagher SP, O'Connor B. 1996. Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 28:441-449.

**Oluwakemi O**, Olufeyisipe A. 2016. DNA fragmentation and oxidative stress compromise sperm motility and survival in late pregnancy exposure to omega-9 fatty acid in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 19:511-520.

**Okuyama A**, Nonomura N, Koh E, Kondoh N, Takeyama M, Nakamura M, Namiki M, Fujioka H, Matsumoto K, Maysuda M. 1988. Induction of renin-angiotensin system in human testis in vivo. *Archives of Andrology* 21:29-35.

**Oluwakemi O**, Olufeyisipe A. 2016. DNA fragmentation and oxidative stress compromise sperm motility and survival in late pregnancy exposure to omega-9 fatty acid in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 19:511-520.

**P**

- Pake JA**, Penn RD & Ryan WG. 1994. Altered sexual function and decreased testosterone in patients receiving intraspinal opioids. *Journal of Pain and Symptom Management* 9:126-131.
- Palermo GC**, Schlegel PN, Colombero L, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z. 1996. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Human Reproduction* 11:1023-1029.
- Papanikolaou EG**, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. 2006. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *The New England Journal of Medicine* 354(11):1139-1146.
- Pardanaud L**, Dieterlenlievre F. 1993. Emergence of endothelial and hematopoietic cells in the avian embryo. *Anatomy and Embryology* 187(2):107-114.
- Parriego M**, Nadal S, Boada M, Tuñón D, Mateo S, Coroleu B, Veiga A. 2013. Evolución y análisis cromosómico de embriones multinucleados. VII Congreso ASEBIR; 2013 Noviembre 20-22 Sevilla. España.
- Parvizi N**. 2000. Neuroendocrine regulation of gonadotropins in the male and the female. *Animal Reproduction Science* 60-61:31-47.
- Paternot G**, Devroe J, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. 2009. Intra- and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7:105.
- Paul M**, Poyan Mehr A, Kreutz R. 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews* 86:747-803.
- Pelinck MJ**, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ, van Echten-Arends J, Arts EG. 2010 Embryo quality and impact of specific embryo characteristics on ongoing implantation in unselected embryos derived from modified natural cycle in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 94(2):527-534.
- Pelinck MJ**, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 13(4):960-963.

## Bibliografía

- Pereira VM**, Reis FM, Cassali GD, Santos SHS, Casalechi M, Santos RAS, Reis AM. 2020. Localization of angiotensin-(1-7) and Mas receptor in the rat ovary throughout the estrous cycle. *Journal of Molecular Histology* 51(6):639-647.
- Pérez I**, Varona A, Blanco L, Gil J, Santaolalla F, Zabala A, Ibarguen AM, Irazusta J, Larrinaga G. 2009. Increased APN/CD13 and acid aminopeptidase activities in head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck* 31:1335-1340.
- Pérez I**. 2011. Alteraciones en la actividad enzimática de peptidasas en neoplasias colorectales. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.
- Pickering SJ**, Taylor A, Johnson MH, Braude PR. 1995. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. *Human Reproduction* 10(7):1912-1922.
- Pinto FM**, Ravina CG, Subiran N, Cejudo-Román A, Fernández-Sánchez M, Irazusta J, Garrido N, Candenás L. 2010. Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8:104.
- Pons MC**, De los Santos MJ, Múgica A, Vilches MA, Arroyo G, González B, Moragas M, García-cerrudo E, Figueroa MJ, Prados F, Busquets A, Hurtado de Medoza MV. 2014. Estudio multicentrico para la validación del criterio de la Asociación par el Esstudio de la Biología de la Reproducción de valoración morfologica de embriones tempranos en día +3 y su asociación con la tasa de nacido vivo. *Medicina Reproducción Embriologica Clinica*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medre.2014.10.001>.
- Prados FJ**, Debrock S, Lemmen JG, Agerholm I. 2012. The cleavage stage embryo. *Human Reproduction* 27(1):50-71.
- Pro B**, Dang NH. 2004. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histology and Histopathology* 19:1345-1351.

## Q

- Quartim C**, Melo MA, Reis S. J. Remohí, J. Bellver, R. Matorras, A. Ballesteros, A. Pellicer. 2012. Estilo de vida y ambiente. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Madrid, Editorial Médica Panamericana. pp.13-23.

## R

- Racowsky C**, Combelles CM, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, Gale S, O'Leary T, Jackson KV. 2003. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reproduction of Biomedicine Online* 6(3):323-331.
- Racowsky C**, Ohno-Machado L, Kim J, Biggers JD. 2009. Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day? *Human Reproduction* 24:2104-2113.
- Racowsky C**, Stern JE, Gibbons WE, Behr B, Pomeroy KO, Biggers JD. 2011. National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate. *Fertility and Sterility* 95(6):1985-1989.
- Ragni G**, Delauretis L, Bestetti O, Sghedoni D, Gambaro V. 1988. Gonadal function in male heroin and methadone addicts. *International Journal of Andrology* 11(2):93-100.
- Rago V**, De Rose D, Santoro M, Panza S, Malivindi R, Andò S, D'Agata R, Aquila S. 2020. Human Sperm Express the Receptor for Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1), Which Affects Sperm Function and Metabolism. *Endocrinology* 161(4):bqaa 031.
- Ramón M**. 2011. Estudio de la actividad aminopeptidásica en espermatozoides astenozoospermicos. Comparación clínica. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Tesis doctoral.
- Ravina CG**, Seda M, Pinto FM. 2007 A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. *Human Reproduction* 22:1617-1625.
- Rawlings ND**, Polgár L, Barret AJ. 1991. A new family of serine peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochemical Journal* 279:907-911.
- Rawlings ND**, Barrett AJ. 1995. En: *Methods Enzymol.* 244:19-61 y 461-86; 248:105-20 y 183-228.
- Rawlings ND**, Barrett A J. 1999. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 27:325-331.
- Rezaei-Mojaz S**, Nazmara Z, Najafi M, Movahedin M, Zandieh Z, Shirinbayan P, Roshanpajouh M, Reza Asgari H, Abbasi M, Koruji M. 2020. Evaluation of enkephalin-degrading enzymes in sperm from heroin-addicted men. *International Journal of Fertility and Sterility* 13(4):301-306.

## Bibliografía

- Rhemrev JP**, Lens JW, McDonnell J, Schoemaker J, Vermeiden JP. 2001. The postwash total progressively motile sperm cell count is a reliable predictor of total fertilization failure during *in vitro* fertilization treatment. *Fertility and Sterility* 76:884-891.
- Ribas-Maynou J**, Barranco I, Sorolla-Segura M, Llavanera M, Delgado-Bermúdez A, Yeste M. 2022. Advanced sperm selection strategies as a treatment for infertile couples: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences* 23(22):13859.
- Rienzi L**, Ubaldi F, Anniballo R, Cerulo G, Greco E. 1998. Preincubation of human oocyte may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 13:1014-1019.
- Re RN**. 2002. The origins of intracrine hormone action. *American Journal of the Medical Sciences* 323:43-48.
- Re RN**. 2003. The intracrine hypothesis and intracellular peptide hormone action. *Bioessays* 25:401-409.
- Re RN**, Cook JL. 2006. An intracrine view of angiogenesis. *Bioessays* 28:943-953.
- Remohí J**, Bellver J, Matorras R, Ballesteros A, Pellicer A. 2012. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Madrid. Editorial Médica Panamericana (4a).
- Remohí J**, Pellicer A, Simon C, Navarro J. 2002. Reproducción Humana. Madrid. Editorial McGraw-Hill-Interamericana.
- Registro SEF**. 2019. Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI). Año 2.019. <https://www.registrosef.com> > sef2019\_IAFIVm.
- Richter KS**, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. 2001. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertility and Sterility* 76(6):1157-1167.
- Riemann D**, Kehlen A, Langner J. 1999. CD13 –not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* 20:83-88.
- Rhoades RA**, Tanner GA. 1997. Fisiología Médica. Masson. Barcelona.
- Roméu C**. 2014. Alteraciones en la actividad enzimática de peptidasas en el líquido folicular. Universidad del País Vasco/Eukal Herriko Unibersitatea. Tesis doctoral.

**Roques BP**, Fournié-Zaluski MC, Soroca E, Lecomte JM, Malfroy B, Llorens C, Schwatz JC. 1980. The enkephalinase inhibitor thiorfan shows anticonceptive activity in mice. *Nature* 288:286-288.

**Roques BP**, Beaumont A. 1990. Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives. *Trends in Pharmacological Sciences* 11:245-249.

**Roseboom TJ**, Vermeiden JP, Schoute E, Lens JW, Schats R. 1995. The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of the patient, cause of infertility, number of embryos transferred and the average morphology score, as revealed by multiple logistic regression analysis. *Human Reproduction* 10(11):3035-3041.

**Ross C**, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, El-Toukhy T. 2010. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive Biomedicine Online* 20:711-723.

**Rubio C**, Gil-Salom M, Simon C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, Remohí J, Pellicer A. 2001. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship 864 with sperm quality and ICSI outcome. *Human Reproduction* 16:2084-2092.

**Ruiz-González I**, Xu J, Wang X, Burghardt RC, Dunlap KA, Bazer FW. 2015. Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: Pregnancy recognition in ewes. *Reproduction* 149:281-291.

**Ruiz-Ortega M**, Esteban V, Egido J. 2007. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine* 17:19-25.

## S

**Sadat-Shirazi MS**, Zarrindast MR, Ashabi G. 2020. Oxidative stress enzymes are changed in opioid abusers and multidrug abusers. *Journal of Clinical Neuroscience* 2:365-369.

**Sadler TW**. 2004. Langman. Embriología médica, 9. argitalpena. Panamericana. Madrid.

**Sakkas D**, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CL. 2015. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Human Reproduction Update* 21:711-726.

## Bibliografía

- Saldeen P**, Sundström P. 2005. Nuclear status of four-cell preembryos predicts implantation potential in in vitro fertilization treatment cycles. *Fertility and Sterility* 84(3):584-589.
- Samplaski MK**, Agarwal A, Sharma R, Sabanegh E. 2010. New generation of diagnostic test for infertility: review of specialized semen test. *International Journal of Urology* 17:839-847.
- Sandalinas M**, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S. 2001. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Human Reproduction* 16:1954-1958.
- Sastry BVR**, Janson VE, Owens LK, Tayeb OS. 1982. Enkephalin-like and substance P-like immunoreactivities of mammalian sperm and accessory sex glands. *Biochemical Pharmacology* 31(21):3519-35122.
- Schlosser J**, Nakib I, Carre-Pigeon F, Staerman F. 2007. Male infertility: definition and pathophysiology. In *Annales d'urologie* 41:127-133.
- Schuel H**, Burkman LJ. 2005. A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm. *Biology of Reproduction* 73(6):1078-1086.
- Scott L**, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. 2007. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Human Reproduction* 22(1):230-240.
- Sehring J**, Beltsos A, Jeelani R. 2022. Human implantation: The complex interplay between endometrial receptivity, inflammation, and the microbiome. *Placenta* 117:179-186.
- Sela R**, Samuelov L, Almog B, Schwartz T, Cohen T, Amit A, Azem F, Ben-Yosef D. 2012. An embryo cleavage pattern based on the relative blastomere size as a function of cell number for predicting implantation outcome. *Fertility and Sterility* 98(3):650-656.
- Semet M**, Paci M, Saïas-Magnan J, Metzler-Guillemain C, Boissier R, Lejeune H, Perrin J. 2017. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology* 5(4):640-663.
- Sharp B**, Pekary AE. 1981.  $\beta$ -endorphin-61-91 and other  $\beta$ -endorphin-immunoreactive peptides in human semen. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 52(3):586-588.
- Shui LJ**, Meng Y, Huang C, Qian Y, Liu JY. 2019. Aminopeptidase N expression in the endometrium could affect endometrial receptivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 514(2):469-474.

- Shaw, M**, Nath, D. 2015. Characterization of a dipeptidyl peptidase and its role in motility of rat epididymal maturing spermatozoa. *Reproductive Biology Insights* 8:9-16.
- Shimomura Y**, Ando H, Furugori K, Kajiyama H, Suzuki M, Iwase A, Mizutani S, Kikkawa F. 2006. Possible involvement of crosstalk cell-adhesion mechanism by endometrial CD26/dipeptidyl peptidase IV and embryonal fibronectin in human blastocyst implantation. *Molecular. Human. Reproduction* 2:491-495.
- Shrimpton CN**, Smith AI, Lew RA. 2002. Soluble metallopeptidases and neuroendocrine signalling. *Endocrine Reviews* 23(5):647-664.
- Simon C**, Martin JC, Galan A, Valbuena D, Pellicer A. 1999a. Embryonic regulation in implantation. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 17:267-274.
- Simon C**, Valbuena D. 1999b. Embryonic implantation. *Annales of Endocrinology* 60:134-136.
- Simon C**, Martin JC, Pellicer A. 2000. Paracrine regulators of implantation. *Baillière ´s Clinical Obstetrics and Gynaecology* 14(5):815-826.
- Simon L**, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI. 2014. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction* 29:2402-2412.
- Simon L**, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. 2017. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection out- come. *Asian Journal of Andrology* 19:80-90.
- Sjöström H**, Norén O, Olsen J. 2000. Structure and function of aminopeptidase N. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 477:25-34.
- Staessen C**, Van Steirteghem A. 1998. The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Human Reproduction* 13(6):1625-1631.
- Styer AK**, Wright DL, Wolkovich AM, Veiga C, Toth TL. 2008. Single-blastocyst transfer decreases twin gestation without affecting pregnancy outcome. *Fertility and Sterility* 89(6):1702-1708.
- Speth RC**, Daubert DL, Grove KL. 1999. Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regulatory Peptides* 79:25-40.

## Bibliografía

- Steer CV**, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. 1992. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Human Reproduction* 7(1):117-119.
- Subirán N**, Agirregoitia E, Valdivia A, Ochoa C, Casis L, Irazusta J. 2008. Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertility and sterility* 89(5):1571-1577.
- Subirán N**, Pinto FM, Agirregoitia E, Candenas L, Irazusta J. 2010. Control of APN/CD13 and NEP/CD10 on sperm motility. *Asian Journal of Andrology* 12(6):899-902.
- Subirán N**, Casis L, Irazusta J. 2011. Regulation of male fertility by the opioid system. *Molecular Medicine* 17(7-8):846-853.
- Sumitomo M**, Ruoquian S, Nanus DM. 2005. Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751:52-59.
- Szeltner Z**, Polgár L. 2008. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Current Protein and Peptide Science* 9:96-107.
- T**
- Taylor A**. 1993. Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *Trends Biochemical Sciences* 18:167-171.
- Tiruppathi C**, Ganapathy V, Leibach FH. 1990. Evidence for tripeptide-proton symport in renal brush border membrane vesicles. Studies in a novel rat strain with a genetic absence of dipeptidyl peptidase IV. *Journal of Biology Chemistry* 265:2048-2053.
- Togo T**, Morisawa M. 1997. Aminopeptidase-like protease released from oocytes affects oocyte surfaces and suppresses the acrosome reaction in establishment of polyspermy block in oocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental Biology* 182:219-227.
- Togo T**, Morisawa M. 2004. GPI-anchored aminopeptidase is involved in the acrosome reaction in sperm of the mussel *mytilusedulis*. *Molecular Reproduction and Development* 67:465-471.
- Trounson A**. 2002. Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. *Reproductive Biomedicine Online* 4(1):58-63.

**Turner AJ.** 1986. Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays Biochemistry* 22:69-119.

**Turner AJ.** 1987. Endopeptidase-24.11 and neuropeptide metabolism. En: *Neuropeptides and their peptidases*. Turner AJ (Eds.). Ellis Horwood Ltd.

**Turner AJ.** 2004. Membrane alanyl aminopeptidase. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Barrett AJ, Rawlings ND y Woessner JE (Eds.). 2ª Edición. Vol. 1. Elsevier Academic Press. pp.289-294.

**Turunen T,** Magris M, Malinen M, Kekäläinen J. 2022. Seminal-Plasma-Mediated Effects on Sperm Performance in Humans. *Cells* 11(14):2147.

## U

**Utleg AG,** Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, Hood L, Lin B. 2003. Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate* 56(2):150-161.

## V

**Valbuena D,** Cano F, Simon C. 1996. La ventana de la implantación. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. XIII:127-132.

**Valdivia A,** Irazusta J, Fernández D, Múgica J, Ochoa C, Casis L. 2004. Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia. *Regulatory Peptides* 122:79-84.

**Van Blerkom J,** Davis P, Alexander S. 2000. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Human Reproduction* 15(12):2621-2633.

**Van de Velde H,** De vos A, Joris H, Nagy ZP, Van Steirteghem AC. 1998. Effect of timing denudation and micro-injection on survival, fertilization and embryo quality alter intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 13:3160-3164.

**Vanhaper T.** 1969. Aminoacyl and dipeptidyl arylamidases (aminopeptidases) of pituitary gland as related to function. *Endocrinology* 85(6):1062-1069.

## Bibliografía

**Van Royen E**, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. 2001. Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Human Reproduction* 16(2):326-332.

**Van Royen E**, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, Gerris J. 2003. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Human Reproduction* 18(5):1062-1069.

**Veeck LL**. 1999. Preembyo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. En: An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group Inc. pp.57-68.

**Veeck LL**. 1999b. Preembyo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. En: An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group Inc. pp.46-51.

**Venditti M**, Chemek M, Minucci S, Messaoudi I. 2020. Cadmium-induced toxicity increases prolyl endopeptidase (PREP) expression in the rat testis. *Molecular Reproduction and Development* 87(5):565-573.

**Vigano P**, Mangioni S, Pompei F, Chiodo I. 2003. Maternal-conceptus Cross Talk – A Review. *Placenta* 24:S56-S61.

**Vinson GP**, Saridogan E, Puddefoot Jr, Djahanbakhch O. 1997. Tissue renin-angiotensin systems and reproduction. *Human Reproduction* 12:651-662.

**Viudes de Castro M**, Casares-Crespo L, Monserrat-Martinez A, Vicente J. 2015. Determination of enzyme activity in rabbit seminal plasma and its relationship with quality semen parameters. *World Rabbit Science* 23:247-253.

## W

**Walter R**, Shlank H, Glass JD, Schwartz IL, Kerenyi TD. 1971. Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science* 173:827-829.

**Watt VM**, Willard HF. 1990. The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis. *Human Genetics* 85:651-654.

**Welches WR**, Santos RA, ChaPpell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM. 1991. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *Journal of Hypertens* 9:631-638.

**Wen XH**, Yang ZW. 2000. Quantitative (stereological) study on the spermatozoal storage capacity of epididymis in rats and monkeys. *Asian Journal of Andrology* 2(1):73-77.

**Wu D**, Khan FA, Huo L, Sun F, Huang C. 2022. Alternative splicing and MicroRNA: epigenetic mystique in male reproduction. *RNA Biology* 19(1):162-175.

**Wu X**, Zhou L, Shi J, Cheng CY, Sun F. 2022. Multiomics analysis of male infertility. *Biology of Reproduction* 107(1):118-134.

## X

**XU J**, Yu Y, Xue M, Lv X. 2022. Intracytoplasmic sperm injection improves normal fertilization rate and clinical pregnancy rate in male infertility. *Contrast Media and Molecular Imaging* 1522636.

## Y

**Yakin K**, Balaban B, Urman B. 2005. Impact of the presence of one or more multinucleated blastomeres on the developmental potential of the embryo to the blastocyst stage. *Fertility and Sterility* 83(1):243-245.

**Yetunde I**, Vasiliki M. 2013. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome. *Minerva Gynecology* 65(5):487-496.

**Yilmaz B**, Konar V, Kutlu S, Sandal S, Canpolat S, Gezen MR & Kelestimur H. 1999. Influence of chronic morphine exposure on serum LH, FSH, testosterone levels, and body and testicular weights in the developing male rat. *Archives of Andrology* 43:189-196.

**Yoshida M**, Kawano N, Yoshida K. 2008. Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65:3446-3457.

**Yoshihara M**, Mizutani S, Kato Y, Matsumoto K, Mizutani E, Mizutani H, Fujimoto H, Osuka S, Kajiyama H. 2021. Recent insights into human endometrial peptidases in blastocyst implantation via shedding of microvesicles. *International Journal of Molecular Sciences* 22(24):13479.

**Yoshimoto T**, Fischl M, Orłowski RC, Walter R. 1978. Post-proline cleaving enzyme and post-proline dipeptidyl aminopeptidase. Comparison of two peptidases with high specificity for proline residues. *Journal of Biological Chemistry* 253:3708-3713.

## Bibliografía

### Z

**Zegers-Hochschild F**, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S, Icmart WHO. 2009. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology. *Human Reproduction* 24(11):2683-2687.

**Zhang E**, Xu F, Liang H, Yan J, Xu H, Li Z, Wen X, Weng J. 2015. GLP-1 receptor agonist exenatide attenuates the detrimental effects of obesity on inflammatory profile in testis and sperm quality in mice. *American Journal of Reproductive Immunology* 74(5):457-466.

**Zorgniotti AW**, Sealfon AI, Toth A. 1980. Chronic scrotal hypothermia as a treatment for poor semen quality. *Lancet* 1(8174):904-906.