

oman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

**“Estudio del Sistema Renina Angiotensina como posible biomarcador para la mejora de los tratamientos de fecundación *in vitro*”**

Memoria para optar al grado de Doctora presentada por:

**Marta Gianzo Citores**

([marta.gianzo@ehu.eus](mailto:marta.gianzo@ehu.eus))

Dirigida por:

**Dr. Jon Irazusta Astiazaran**

**Dra. Nerea Subirán Cuidad**

Leioa, 2016

© Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU)  
- *Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Argitalpen Zerbitzua*  
- University of the Basque Country - UPV/EHU Press  
- **ISBN: 978-84-9082-390-3**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quería empezar agradeciendo a mis directores de tesis, Jon y Nerea, toda la confianza, el apoyo y la ayuda que me han brindado durante todo este tiempo.

A todo el personal de la Clínica IVI Bilbao, embriólogos, técnicos de los laboratorios de FIV y andrología, ginecólogos, enfermeras, auxiliares, personal de recepción y administración, técnicos de mantenimiento, personal de limpieza, a todos, gracias por el trato que siempre me habéis ofrecido.

A Edurne y a Francisco, con quienes tuve la oportunidad de dar mis primeros pasos en la universidad y de conocer el mundo de la infertilidad.

A Rosaura, quien sin apenas conocerme confió en mí. Y si no hubiese sido por eso, no habría optado a la beca que me ha conducido hasta aquí.

A todos los profesores, técnicos y demás personal del departamento de fisiología. Así, como a los técnicos de Sgiker, en especial a Alex por su ayuda, amabilidad y disponibilidad.

A todas las personas de la Unidad de Reproducción Asistida de Quirón Bilbao, porque el tiempo que he estado con vosotros me ha servido para aprender a interpretar mejor mis resultados, pero sobre todo por enseñarme una forma de trabajar muy humana y por haberme acogido como a una más.

A mis compañeros, Iraia, Itziar, Maider, Haizea, Ainhoa, Peio, Gotzone, Garaitz y demás personas que han pasado por nuestro laboratorio durante todo este tiempo. Por todas las terapias de grupo, los buenos momentos, por vuestra locura y por toda vuestra ayuda, GRACIAS!!!!

A mis compañeros de la carrera de biología. A mis amigas y amigos. Porque a partir de ahora ya seré libre y tendré más tiempo para estar con vosotros.

A mi familia y sobre todo a mis padres, por estar siempre ahí.

A Javi, porque sin duda eres la persona que más ha sufrido esta tesis. Gracias por hacerme sonreír, por animarme, por escucharme, por tu apoyo incondicional.

A todos, muchas gracias de corazón

*Marta*



---

## RESUMEN

Hoy día la infertilidad se ha convertido en un problema médico y social de gran importancia mundial, estando implicado el factor masculino en la mitad de los casos. Actualmente, el análisis del semen constituye la única herramienta disponible para evaluar el estatus fértil del varón, aunque presenta ciertas limitaciones, sobre todo en los casos de infertilidad de origen desconocido. A pesar de que las técnicas de reproducción asistida (TRA) han supuesto un tratamiento efectivo en muchos de estos casos, todavía quedan distintos aspectos a mejorar que minimicen sus riesgos, como los embarazos múltiples, o mejoren su efectividad, ya que sólo el 30% de los embriones transferidos resultan en un embarazo evolutivo. Así, el uso de biomarcadores moleculares basados en la fisiología espermática podría mejorar el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina. El sistema renina angiotensina (RAS) es un sistema molecular que actúa en la fertilidad masculina interviniendo en distintos niveles, como la regulación de la función espermática, lo que supondría que este sistema podría ser usado como diana terapéutica para la mejora de las TRA. Sin embargo, todavía se desconocen diversas cuestiones sobre la presencia y funciones de los distintos elementos del RAS en los espermatozoides humanos. Este trabajo se ha centrado en describir los receptores de los dos principales péptidos bioactivos de este sistema, el receptor de angiotensina II tipo 2 (AT2R) y el receptor de prorenina-renina (PRR), así como en estudiar la relación de estos dos receptores y de dos enzimas descritas como esenciales en la función espermática, la enzima convertidora de angiotensina testicular (tACE) y la aminopeptidasa N (APN), con los parámetros evaluados durante los tratamientos de fecundación *in vitro*. Mediante técnicas de RT-PCR, western blot, inmunofluorescencia y citometría de flujo, se demuestra por primera vez la presencia a nivel génico y proteico de los receptores AT2R y PRR en los espermatozoides humanos. Por otra parte, mediante citometría de flujo, se pudieron establecer diversas relaciones entre los receptores y las enzimas del RAS estudiados en espermatozoides con los parámetros y etiologías seminales. Además, se ha podido determinar que estos componentes también se relacionan con las tasas de fecundación y la calidad, desarrollo y viabilidad de los embriones obtenidos durante los diferentes tratamientos de fecundación *in vitro*. Estos resultados confirman que los espermatozoides no son meros portadores del DNA paterno, sino que las características moleculares espermáticas contribuyen a la fecundación y al desarrollo embrionario, de forma que estos receptores y enzimas podrían ser considerados biomarcadores de la función y selección espermática.

---

## ABSTRACT

Infertility has become a major medical and social problem worldwide, and about half of the causes of infertility are due to male factor. Nowadays, the analyses of standard semen parameters, such as quantity, motility, and morphology, are commonly used to determine the fertility status of men. However, the predictive value of this standard semen analysis is limited, specifically in idiopathic cases of infertility. Assisted reproduction techniques (ART) have been supposed an effective treatment for infertility, although there are still several areas to improve in order to minimize their risks, such as multiple pregnancies, and to increase the effectiveness. In fact, only 30% of transferred embryos results in an ongoing pregnancy. In this way, the development of molecular biomarkers based on sperm physiology could improve the diagnosis and treatment of male infertility. The renin-angiotensin system (RAS) is a molecular system that acts on male fertility operating at multiple levels. In fact, RAS is involved on the regulation of sperm fertility, suggesting its potential role as a therapeutic target for improving ART. However, the presence of RAS in human spermatozoa is not completely understood and its role remains still unknown. Therefore, the main aim of this thesis, is to describe the presence of the receptors of the main bioactive peptides of this system, the angiotensin II type 2 receptor (AT2R) and the prorenin-renin receptor (PRR), and to elucidate the role of these receptors, and two enzymes essential in sperm functions, the testicular angiotensin converting enzyme (tACE) and the aminopeptidase N (APN), as tools to improve the effectiveness of *in vitro* fertilization treatments. This work describes for the first time the presence of AT2R and PRR at gene and protein level in human spermatozoa by RT-PCR, western blot, immunofluorescence and flow cytometry assays. Flow cytometry analysis establishes relationships between the receptors or enzymes of RAS studied in spermatozoa and seminal parameters and etiologies. Moreover, it has also been determined that both receptors and both enzymes are related to fertilization rates and the quality, development and viability of the embryos obtained during different types of *in vitro* fertilization techniques. These results confirm that sperm cells are not simple carriers of paternal genome, but spermatozoa molecular features also contribute to fertilization and embryo development. These findings could help to understand the role of RAS in human spermatozoa, meaning that these receptors and enzymes could be considered biomarkers of sperm function and selection.





---

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. Infertilidad Humana y Técnicas de Reproducción Asistida</b> .....	3
1.1. Técnicas de reproducción asistida .....	6
1.2. Métodos de evaluación y selección de embriones .....	8
1.2.1. Evaluación y selección de embriones tempranos .....	9
1.2.2. Evaluación y selección de embriones en fases avanzadas del desarrollo <i>in vitro</i> .....	10
<b>2. Infertilidad masculina</b> .....	14
2.1. Causas de la infertilidad masculina .....	15
2.2. Estudio inicial de la infertilidad masculina .....	17
2.3. El espermograma .....	18
<b>3. El espermatozoide</b> .....	22
3.1. Estructura del espermatozoide humano .....	23
3.2. Espermatogénesis .....	25
3.2.1. Fase mitótica .....	27
3.2.2. Fase meiótica .....	27
3.2.3. Espermiogénesis .....	28
3.3. Maduración post-testicular .....	29
<b>4. Marcadores moleculares relacionados con la fertilidad espermática</b> .....	32
4.1. Métodos actuales de selección objetiva de espermatozoides .....	33
4.1.1. Aislamiento de espermatozoides por su carga eléctrica .....	33
4.1.2. Separación inmunomagnética de espermatozoides mediante columnas de Anexina V .....	35
4.1.3. Selección de espermatozoides con receptores de ácido hialurónico .....	36
4.1.4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente (IMSI) .....	36
4.1.5. Selección de espermatozoides birrefringentes .....	37
4.2. Marcadores moleculares de infertilidad masculina .....	39
4.2.1. Marcadores de estrés oxidativo .....	39
4.2.2. Marcadores apoptóticos .....	41
4.2.3. Ubiquitina .....	42
4.2.4. Integridad del DNA .....	42
4.2.4.1. Empaquetamiento anómalo de cromatina .....	43

---

4.2.4.2. Estrés oxidativo (EO).....	43
4.2.4.3. Apoptosis .....	44
4.2.4.4. Fragmentación del ADN .....	44
4.2.5. Otros Marcadores moleculares de la función espermática .....	46
4.3. Aplicación de las ciencias “-ómicas” en el estudio de la funcionalidad espermática .....	47
4.3.1. Transcriptómica.....	48
4.3.2. Proteómica.....	49
<b>5. Sistema Renina-Angiotensina .....</b>	<b>51</b>
5.1. Descripción del Sistema Renina-Angiotensina (RAS) .....	51
5.1.1. RAS clásico o sistémico .....	51
5.1.2. RAS local o tisular .....	52
5.1.3. RAS intracelular .....	52
5.2. Ejes o vías que componen el RAS .....	53
5.3. Componentes de RAS.....	54
5.3.1. Angiotensinógeno y angiotensinas.....	55
5.3.2. Receptores .....	57
5.3.3. Principales enzimas .....	59
5.4. Principales funciones del SRA .....	60
<b>6. El RAS en la fertilidad masculina .....</b>	<b>63</b>
6.1. El RAS y su implicación en la función testicular .....	63
6.1.1. Regulación del RAS testicular por las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario .....	64
6.1.1.1. Efectos sobre el AGT y las angiotensinas .....	64
6.1.1.2. Efectos sobre los receptores del RAS local .....	64
6.1.1.3. Efectos sobre las enzimas del RAS local .....	64
6.1.2. Regulación de la función testicular mediante el RAS local .....	65
6.1.2.1. Funciones del AGT y las angiotensinas sobre la función testicular .....	66
6.1.2.2. Funciones de los receptores del RAS sobre la función testicular .....	67
6.1.2.3. Funciones de las enzimas del RAS sobre la función testicular .....	68
6.2. El RAS y su implicación en la función espermática .....	71
6.2.1. Funciones del AGT y las angiotensinas sobre la función espermática.....	71

---

6.2.2. Funciones de los receptores del RAS sobre la función espermiática.....	72
6.2.3. Funciones de las enzimas del RAS sobre la función espermiática.....	73
6.3. Conclusiones.....	75
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>79</b>
<b>1. Objetivo general .....</b>	<b>82</b>
<b>2. Objetivos específicos .....</b>	<b>82</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>85</b>
<b>0. Criterios de inclusión, análisis y preparación de las muestras seminales .....</b>	<b>88</b>
0.1. Criterios de inclusión .....	88
0.2. Determinación de las características seminales. Elaboración del espermiograma.....	89
0.2.1. Determinación de los parámetros básicos del semen.....	89
0.3. Procesamiento de las muestras seminales .....	92
0.3.1. Procesamiento de las muestras mediante swim-up .....	92
0.3.2. Procesamiento de las muestras mediante gradientes de densidad.....	92
<b>1. <u>Objetivo 1</u>: Estudio de la expresión y localización del AT2R y PRR en espermatozoides humanos .....</b>	<b>94</b>
1.1. Real Time RT-PCR.....	94
1.1.1. Extracción y purificación del RNA.....	94
1.1.2. Control de calidad del RNA .....	95
1.1.3. Retrotranscripción (síntesis de cDNA) .....	95
1.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	96
1.2. Western blot (Inmunoblotting) .....	97
1.2.1. Preparación de las muestras .....	98
1.2.2. Cuantificación de proteínas mediante el método de BCA.....	99
1.2.3. Electroforesis (SDS-PAGE).....	99
1.2.4. Transferencia.....	101
1.2.5. Inmunodetección .....	101
1.3. Citometría de flujo.....	102
1.3.1. Preparación de las muestras.....	103

---

1.3.2. Citometría semi-cuantitativa .....	104
1.4. Inmunocitoquímica .....	106
<b>2. <u>Objetivo 2:</u> Relación del AT2R, PRR, tACE y APN con los parámetros seminales.....</b>	<b>109</b>
2.1. Citometría de flujo .....	109
2.1.1. Preparación de las muestras .....	109
2.1.2. Citometría semi-cuantitativa .....	109
2.1.3. Citometría cuantitativa .....	109
2.2. Variables de estudio.....	112
<b>3. <u>Objetivo 3:</u> Relación del AT2R, PRR, tACE y APN con los parámetros embrionarios .....</b>	<b>113</b>
3.1. Donación de oocitos .....	113
3.1.1. Selección de las donantes .....	113
3.1.2. Estimulación ovárica de las donantes.....	114
3.1.3. Preparación endometrial de las receptoras.....	115
3.2. Punción ovárica y recuperación de los oocitos .....	115
3.3. Técnicas de fecundación <i>in vitro</i> .....	116
3.3.1. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) .....	116
3.3.2. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) .....	117
3.3.2.1. Preparación de oocitos para la ICSI .....	117
3.3.2.2. Metodología de la ICSI .....	117
3.4. Análisis de la fecundación y evaluación embrionaria .....	117
3.4.1. Evaluación de la fecundación .....	117
3.4.2. Evaluación de la calidad embrionaria de embriones tempranos.....	118
3.4.2.1. Número de células.....	119
3.4.2.2. Porcentaje de fragmentación celular .....	119
3.4.2.3. Igualdad en el tamaño o simetría de los blastómeros.....	119
3.4.3. Evaluación de los blastocistos .....	120
3.5. Variables de estudio.....	121
<b>4. <u>Objetivo 4:</u> Relación del AT2R, PRR, tACE y APN con los resultados de las TRA .....</b>	<b>123</b>
4.1. Transferencia embrionaria .....	123
4.2. Valoración de la gestación.....	123
4.3. Variables de estudio.....	123
<b>5. Análisis estadístico de los datos .....</b>	<b>125</b>

---

<b>IV. RESULTADOS</b> .....	127
<b>1. Expresión y localización del AT2R y del PRR en espermatozoides humanos</b> .....	129
1.1. Características de las muestras seminales .....	129
1.2. Expresión génica del AT2R y del PRR .....	129
1.3. Expresión proteica del AT2R y del PRR .....	130
1.3.1. Determinación de la presencia del AT2R y del PRR mediante western blot.....	130
1.3.2. Determinación del porcentaje de espermatozoides que expresan el AT2R y el PRR mediante citometría de flujo .....	131
1.3.3. Determinación de la localización del AT2R y del PRR mediante inmunocitoquímica.....	132
1.4. Resumen de los resultados del primer objetivo .....	133
<b>2. Relación del AT2R, el PRR, la tACE y la APN con los parámetros seminales</b> .....	134
2.1. Datos epidemiológicos de los varones y características de las muestras seminales .....	135
2.2. Análisis de características seminales en relación con el AT2R, el PRR, la tACE y la APN.....	137
2.2.1. Volumen .....	137
2.2.2. Concentración .....	137
2.2.3. Movilidad .....	138
2.3. Análisis de las distintas etiologías seminales en relación con el AT2R, el PRR, la tACE y la APN .....	141
2.3.1. Estimación del poder predictivo de los componentes del RAS en las etiologías seminales.....	144
2.4. Resumen de los resultados del segundo objetivo .....	146
2.4.1.AT2R.....	146
2.4.2.PRR.....	146
2.4.3.tACE .....	146
2.4.4.APN.....	147
<b>3. Relación de AT2R, PRR, tACE y APN con los parámetros embrionarios</b> ....	148
3.1. Datos epidemiológicos de las pacientes y variables de laboratorio .....	148
3.2. Relación de las tasas de fecundación con el AT2R, el PRR, la tACE y la APN.....	149

---

3.3. Relación del desarrollo embrionario temprano con el AT2R, el PRR, la tACE y la APN .....	150
3.3.1. Embriones en día 2 de desarrollo.....	150
3.3.1.1. Calidad embrionaria .....	150
3.3.1.2. Número de células.....	153
3.3.1.3. Número de células, fragmentación y simetría de las cohortes embrionarias.....	155
3.3.2. Embriones en día 3 de desarrollo.....	156
3.3.2.1. Calidad embrionaria .....	156
3.3.2.2. Número de células.....	159
3.3.2.3. Número de células, fragmentación y simetría de las cohortes embrionarias.....	161
3.4. Relación del desarrollo embrionario avanzado con el AT2R, el PRR, la tACE y la APN .....	162
3.4.1. Embriones en D+5 de desarrollo .....	162
3.4.1.1. Estadio de desarrollo .....	162
3.4.1.2. Viabilidad del blastocistos.....	165
3.4.2. Embriones en día 6 de desarrollo.....	169
3.4.2.1. Estadio de desarrollo .....	169
3.4.2.2. Viabilidad de los blastocistos .....	172
3.4.3. Destino final del embrión .....	175
3.5. Resumen de los resultados del tercer objetivo .....	177
3.5.1. AT2R.....	177
3.5.2. PRR.....	177
3.5.3. tACE .....	177
3.5.4. APN .....	177
<b>4. Relación del AT2R, el PRR, la tACE y la APN con los resultados de las TRA .....</b>	<b>179</b>
4.1. Transferencia .....	180
4.2. Transferencia en D+3 vs D+5-D+6 .....	182
4.3. Embarazo bioquímico .....	184
4.4. Implantación.....	186
4.5. Gestación clínica .....	188
4.6. Resumen de los resultados del cuarto objetivo .....	190

---

<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	193
<b>1. AT2R</b> .....	195
1.1. Descripción del AT2R en los espermatozoides humanos.....	196
1.2. Relación con los parámetros seminales.....	198
1.3. Relación con los parámetros embrionarios.....	200
1.3.1. Fecundación del oocito.....	200
1.3.2. Desarrollo embrionario temprano .....	201
1.3.3. Desarrollo embrionario avanzado. Estadio de blastocisto .....	202
1.4. Relación con los resultados de las TRA .....	204
<b>2. PRR</b> .....	206
2.1. Descripción del PRR en los espermatozoides humanos.....	206
2.2. Relación con los parámetros seminales.....	208
2.3. Relación con los parámetros embrionarios.....	209
2.3.1. Fecundación del oocito.....	209
2.3.2. Desarrollo embrionario temprano .....	209
2.3.3. Desarrollo embrionario avanzado. Estadio de blastocisto .....	210
2.4. Relación con los resultados de las TRA .....	211
<b>3. tACE</b> .....	213
3.1. Relación con los parámetros seminales.....	213
3.2. Relación con los parámetros embrionarios.....	215
3.2.1. Fecundación del oocito.....	216
3.2.2. Desarrollo embrionario temprano .....	216
3.2.3. Desarrollo embrionario avanzado. Estadio de blastocisto .....	218
3.3. Relación con los resultados de las TRA .....	219
<b>4. APN</b> .....	221
4.1. Relación con los parámetros seminales.....	221
4.2. Relación con los parámetros embrionarios.....	224
4.2.1. Fecundación del oocito.....	224
4.2.2. Desarrollo embrionario temprano .....	225
4.2.3. Desarrollo embrionario avanzado. Estadio de blastocisto .....	226
4.3. Relación con los resultados de las TRA .....	228
<b>5. Discusión general</b> .....	230
<b>VI. Conclusiones</b> .....	237
<b>VII. Bibliografía</b> .....	243

---

<b>VIII. Anexos</b> .....	275
<b>1. Anexo I:</b> Gradación de la calidad embrionaria según la 2ª Revisión de los Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos.....	277
<b>2. Anexo II:</b> Listado de reactivos y materiales de laboratorio y equipos y programas informáticos .....	281
<b>3. Anexo III:</b> Artículo y comunicaciones procedentes de esta tesis.....	285





# I. INTRODUCCIÓN



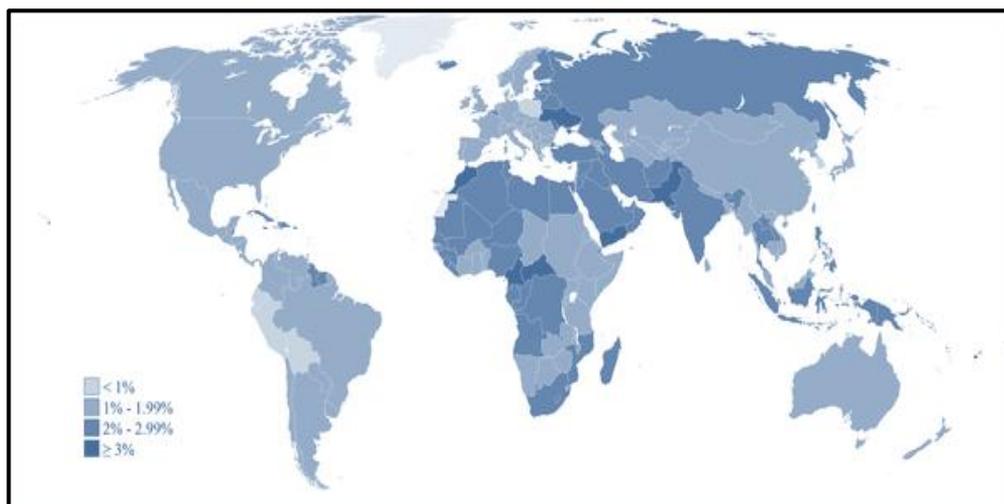
## **1. Infertilidad Humana y Técnicas de Reproducción Asistida**

Hoy día la infertilidad se ha convertido en un problema médico y social de gran importancia mundial. De hecho, en 2010 se estimó que más de 48,5 millones de parejas de todo el mundo padecían problemas de infertilidad (Mascarenhas *et al.*, 2012). Esta incapacidad genésica, o de engendrar descendencia, aunque afecta a hombres y a mujeres de todo el mundo, presenta distintos valores de prevalencia en diferentes zonas geográficas (Figura 1). Entre sus consecuencias, además de problemas psicológicos, como estrés y depresión, también se encuentran la discriminación y el ostracismo. Sin embargo, no solamente genera problemas físicos, psicológicos y sociales, sino que también representa una importante carga económica (Mascarenhas *et al.*, 2012). En los países occidentales, la prevalencia de la infertilidad se sitúa en torno al 14%, lo que supone que una de cada seis parejas en edad reproductiva presenta dificultades para tener descendencia (ESHRE, 2014).

## Introducción

---

Desde el punto de vista de la medicina reproductiva, se entiende por **infertilidad** la incapacidad de una pareja para tener hijos. Hasta hace unos años se diferenciaba entre esterilidad (o dificultad para conseguir el embarazo) e infertilidad (dificultad para conseguir que los embarazos concluyeran en recién nacidos), sin embargo, actualmente son considerados sinónimos. La definición más comúnmente aceptada de *esterilidad/infertilidad* es la de la ausencia de consecución de embarazo tras 12 meses de relaciones sexuales frecuentes no protegidas. Esta definición es 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). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) prolonga este tiempo a 24 meses (Matorras y Crisol, 2011).



**Figura 1.** Valores de prevalencia de infertilidad primaria del año 2010. Imagen modificada de Mascarenhas *et al.*, 2012.

Existen una serie de situaciones, como edad de la mujer o la presencia de distintas patologías masculinas o femeninas (Tabla 1), en las que se aconseja el inicio del estudio de esterilidad antes de que transcurra un año o incluso el inicio directo un tratamiento de reproducción asistida (Alamá y Remohí, 2011).

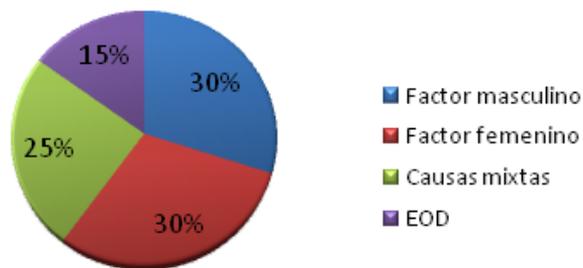
Factores para el estudio precoz de la pareja estéril	
Mujer	Hombre
Edad > 35 años	Patología genital previa
Amenorrea u oligomenorrea > de 6 meses	Cirugía urogenital previa
Enfermedad pélvica inflamatoria	Enfermedades de transmisión sexual
Cirugía abdominal pélvica	Exploración genital anormal
Patología tubárica, uterina u ovárica	Enfermedades genéticas
Endometriosis	
Enfermedades genéticas	

**Tabla 1.** Factores que aconsejan el estudio precoz de la pareja. Modificados de Alamá y Remohí, 2011.

Debido a la complejidad de los procesos de infertilidad/esterilidad, se han definido, además varios términos relacionados con la medicina reproductiva. Asimismo, la infertilidad puede dividirse en primaria y secundaria. El término de **infertilidad primaria** hace referencia a la imposibilidad de tener un recién nacido vivo, mientras que se considera **infertilidad secundaria** cuando tras una gestación previa, transcurren más de 12 meses sin conseguir un nuevo embarazo (Mascarenhas *et al.*, 2012). Habitualmente, además, se distingue entre esterilidad absoluta y esterilidad relativa o subfertilidad. La **esterilidad absoluta** corresponde a situaciones en las que hay un impedimento total para la consecución del embarazo. Mientras que la **subfertilidad o esterilidad relativa** hace referencia a situaciones en las que el impedimento en la fecundidad es parcial, de forma que existe algún problema que determina que la fecundidad sea más baja de lo normal, pero no nula. Esta sería la situación más común entre las parejas que consultan en la actualidad por problemas reproductivos (Matorras y Crisol, 2011). Otros términos usados en medicina reproductiva son fecundabilidad y fecundidad. La **fecundabilidad** se define como la probabilidad de conseguir un embarazo durante un ciclo menstrual. Mientras que la **fecundidad** hace referencia a la capacidad para conseguir un feto vivo y viable en un ciclo menstrual con exposición al coito (Matorras y Hernández, 2007).

Hoy día se sabe que la esterilidad puede ser de causa femenina, masculina o mixta, afectando a los dos miembros de la pareja. Además actualmente se sabe que, el factor masculino está involucrado en 30% de los casos, otro 30% de los casos es

debido al factor femenino, el 25% son de etiología mixta y el restante 15% comprende casos de esterilidad de origen desconocido (Figura 2); por lo que generalmente se asume que el 50% de los casos es de origen masculino y el otro 50% femenino (Collins, 2004; Dohle *et al.*, 2005). Estos datos indican que la esterilidad debe ser entendida como una enfermedad de pareja, donde ambos progenitores deben ser estudiados con la misma atención y la misma intensidad. (Alamá y Remohí, 2011).



**Figura 2.** Distribución de las causas de la esterilidad. EOD: esterilidad de origen desconocido.

Durante los últimos años, el número de tratamientos de reproducción asistida realizados han ido aumentando un 5-10% anual en países desarrollados. Asimismo, se estima que desde que tuviese lugar el nacimiento del primer niño concebido mediante técnicas de reproducción asistida, en el mundo han nacido más de 5 millones de niños gracias a dichos procedimientos (ESHRE, 2014). Debido a esto, la aparición y desarrollo de las técnicas de reproducción asistida (TRA) ha resultado ser uno de los grandes avances para el tratamiento de la infertilidad (Khorram *et al.*, 2001; Chemes y Álvarez Sedo, 2012), incrementando las posibilidades de éstas parejas de concebir y en definitiva del éxito reproductivo

### 1.1. Técnicas de Reproducción Asistida

A día de hoy, las TRA presentan tres grandes grupos de tratamientos diferentes, en función de los resultados obtenidos en las pruebas diagnósticas: la inseminación artificial (IA), la fecundación *in vitro* y la donación de oocitos (Alamá y Remohí,

2011). La **IA** es la técnica mediante la cual, se deposita el semen capacitado dentro del útero. Esta se puede realizar tanto con semen de su pareja (IAC) o con semen de donante (IAD). Por otra parte, las **técnicas de fecundación *in vitro*** se basan en la unión de los gametos masculino y femenino en el laboratorio. Posteriormente, los embriones resultantes son transferidos al útero para conseguir una gestación. Finalmente, **la donación de oocitos** es la TRA en la cual los oocitos proceden de una mujer distinta a la que se le va a realizar la transferencia embrionaria. Actualmente, esta técnica cuenta con una amplia aceptación debida principalmente a que constituye la TRA con mejores resultados (Alamá y Remohí, 2011).

Hoy por hoy, las TRA más usadas son los tratamientos de fecundación *in vitro* (Machtinger y Racowsky, 2013). Estos tratamientos a su vez se pueden dividir en dos, la **fecundación *in vitro*** convencional (FIV) y **la inyección intracitoplasmática de espermatozoides** (ICSI). La técnica de FIV consiste en la coincubación de los gametos masculinos y femeninos de manera que un espermatozoide de forma espontanea fecunda un oocito. Mientras que en la técnica de ICSI, la fecundación se realiza seleccionando e inyectando un único espermatozoide en cada oocito. La ICSI supuso una gran revolución en los tratamientos de fecundación *in vitro*, al lograr gestaciones incluso en los casos de muy mal pronóstico, como los casos de infertilidad debidos al factor masculino severo (Matorras y Hernández, 2007).

A pesar de ello, los tratamientos de infertilidad son económicamente elevados para la sociedad y/o para las personas afectadas. Entre otras razones esto es debido a que en numerosas ocasiones, estos procesos se alargan en el tiempo ya que las TRA no siempre garantizan el éxito reproductivo de la pareja infértil en un primer tratamiento (Boivin *et al.*, 2007; Farquhar *et al.*, 2014). Una de las complicaciones más importantes de estas técnicas, es el embarazo múltiple. Lo que no sólo supone riesgos médicos (tanto perinatales como neonatales) sino también importantes consecuencias socioeconómicas. Los riesgos de las gestaciones múltiples incluyen parto prematuro con numerosas secuelas, bajo peso al nacer y un dramático incremento en el riesgo relativo de parálisis cerebral (Matorras y Hernández, 2007). La transferencia de un sólo embrión en los tratamientos de fecundación *in vitro*, es una solución efectiva que minimiza la incidencia de embarazos múltiples después de los tratamientos (Glujovsky *et al.*, 2012; Machtinger y Racowsky, 2013; Van den Abbeel *et al.*, 2013).

Considerando que hay que transferir un sólo embrión, la selección de este es crucial (Ruvolo *et al.*, 2013; Machtinger y Racowsky, 2013; Van den Abbeel *et al.*, 2013). Actualmente, la selección primaria se basa en criterios morfológicos observados al microscopio óptico. Aunque estos criterios se relacionan con resultados de embarazo, no obstante, presentan límites en los valores predictivos de la evolución de la gestación (Meseguer *et al.*, 2011; Machtinger y Racowsky, 2013).

### **1.2. Métodos de evaluación y selección de embriones**

De forma rutinaria, en los laboratorios de embriología humana se trabaja con una serie de variables que proporcionan información sobre el estado y la evolución de los embriones (ASEBIR, 2008; Machtinger y Racowsky, 2013; ASEBIR, 2015). Esta valoración morfológica de los embriones se ha venido utilizado desde los comienzos de las técnicas de fecundación *in vitro*, en un principio para definir el desarrollo del embrión y más tarde como una herramienta para seleccionar los mejores embriones para la transferencia, es decir, los que tienen el mayor potencial de implantación. Así, los métodos actuales de selección embrionaria incluyen el análisis de los gametos y embriones en distintas etapas del desarrollo, desde la observación de los pronúcleos en los cigotos, pasando por las sucesivas divisiones embrionarias hasta que se alcanza el estadio de blastocisto (Rienzi *et al.*, 2005, ASEBIR, 2008; Machtinger y Racowsky, 2013; ASEBIR, 2015).

El sistema de gradación embrionaria propuesto por la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), establece un sistema de 4 categorías (A, B, C o D), divididas en función del potencial implantatorio esperado (Tabla 2) (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015). Considerándose como embriones de buena calidad los correspondientes a las calidades A y B, los embriones de calidad subóptima los clasificados con calidad C, y los de mala calidad los pertenecientes a la categoría D (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Esta clasificación supone que, la calidad embrionaria es un indicador predictivo del éxito del tratamiento.

Sistema de gradación embrionaria	
Categoría	Descripción
A	embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación
B	embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación
C	embrión regular con una probabilidad de implantación media
D	embrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja

**Tabla 2.** Sistema de gradación embrionaria según los criterios de ASEBIR (ASEBIR, 2008).

La asignación de un embrión a una categoría depende de la combinación de las valoraciones de distintos parámetros morfocinéticos. De igual manera, en la determinación de la calidad de un embrión no debe tenerse en cuenta únicamente las características observadas en un momento determinado de su desarrollo, sino que es necesario considerar los aspectos observados en estadios anteriores. De forma que la calidad final del embrión debe ser dependiente de todas las observaciones realizadas a lo largo del desarrollo (ASEBIR, 2008).

### 1.2.1. Evaluación y selección de embriones tempranos

El desarrollo embrionario humano sigue una secuencia de eventos cuyo cronograma está perfectamente determinado. Tradicionalmente, la valoración de estos estadios embrionarios tempranos, días 2 y 3 de desarrollo (D+2 y D+3), ha constituido la base de la determinación de la calidad embrionaria (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015).

En la asignación de la calidad embrionaria temprana se tienen en cuenta una serie de parámetros morfológicos y morfocinéticos. Estos parámetros evaluados son: 1) el número de células y ritmo de división; 2) el porcentaje y tipo de fragmentación celular; 3) la desigualdad en el tamaño o simetría de los blastómeros; 4) el contorno de los blastómeros; 5) la visualización de núcleos y grado de multinucleación de los blastómeros; 6) la presencia de anillo citoplasmático; 7) la presencia de vacuolas; 8) el aspecto de la zona pelúcida; 9) el grado de compactación/adhesión temprana; y 10) la presencia de pitting o moteado (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015).

La asignación de un embrión a una determinada categoría depende de la valoración conjunta de todas las variables que han sido citadas previamente (ANEXO I) (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015).



**Figura 3.** Desarrollo embrionario hasta día 3 de desarrollo. **A)** oocito maduro; **B)** oocito fecundado o cigoto; **C)** embrión en día 2 de desarrollo (D+2) y **D)** embrión en día 3 de desarrollo (D+3).

Asimismo, los avances en el conocimiento de la fisiología del embrión en sus estadios iniciales de evolución han ayudado al desarrollo de sistemas de cultivo capaces de prolongar el cultivo embrionario hasta el estadio de blastocisto (Matorras y Hernández, 2007). No todos los embriones son capaces de llegar a la fase de blastocisto, de hecho, sólo entre el 40% y el 60% de los oocitos fecundados *in vitro* llegan a este estadio, y esta capacidad está directamente relacionada con la morfología que presenta el embrión en estadios más tempranos (ASEBIR, 2015). Así, la capacidad de desarrollo del embrión para llegar *in vitro* a la etapa de blastocisto también ha sido propuesta como un indicador de potencial de implantación de los embriones (Rienzi *et al.*, 2005).

### **1.2.2. Evaluación y selección de embriones en fases avanzadas del desarrollo *in vitro***

Entre el tercero y el cuarto día de cultivo, se inicia la formación de puentes intercelulares y los blastómeros de los embriones se empiezan a compactar, lo que impide que se distingan los contornos de cada uno de ellos claramente. A partir de este momento, los embriones pasan a estadio de **mórula** (Alikani *et al.*, 2000; ASEBIR, 2008). La compactación celular es una característica que presentan los embriones alrededor del cuarto día de cultivo (D+4), aunque se inicia en los

estadios cercanos a las 8 células. La visualización de la compactación en D+4 responde a un buen pronóstico de desarrollo (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015).

Tras la compactación de los blastómeros, se produce una diferenciación de las células en dos estructuras embrionarias. Siendo posible diferenciar la población de células o masa celular interna (MCI), que constituirá el embrión propiamente dicho, y una monocapa celular o trofoectodermo embrionario (TE) que, por el contrario, dará lugar a la placenta y demás membranas extraembrionarias. En este estadio de evolución, los embriones reciben el nombre de **blastocisto**. Se considera que un embrión cultivado *in vitro* alcanza el estadio de blastocisto en D+5 o D+6, aunque este rango de tiempo puede variar dependiendo del sistema de cultivo utilizado (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015).

Conforme las células del blastocisto se multiplican, van produciendo un líquido que forma una cavidad en el centro del embrión, el blastocele. Mientras, el blastocisto crece extraordinariamente de tamaño hasta que la zona pelúcida cede y se rompe en un punto. Es por esta zona, por donde el blastocisto en eclosión (hutching) comienza a salir de la zona pelúcida para poder implantar en el endometrio uterino. De forma que, desde el estadio de mórula hasta que el embrión eclosiona para la implantación, se pueden determinar distintos estadios de evolución acordes al patrón de desarrollo y a su morfología. Así, los blastocistos pueden ser clasificados como: blastocisto temprano (BT), blastocisto en expansión o cavitado (BC), blastocisto expandido (BE), y blastocisto en eclosión o en fase de hutching (BHi) (Figura 4) (Machtinger y Racowsky, 2013).

Conforme a los acuerdos alcanzados en el Consejo de Estambul sobre la evaluación de los embriones, el sistema de gradación de los blastocistos debe resultar de una combinación entre su evolución y la valoración de la masa celular interna MCI y el TE (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Para ello, en la determinación del estadio de evolución se tiene en cuenta el volumen del embrión está ocupado por el blastocele. Por otra parte, para la valoración de la MCI se considera el tamaño, la forma y el grado de compactación de las células que componen dicha estructura. Finalmente, el TE se evalúa según su estructura y el número de células que lo componen (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015).

## Introducción

---

Este sistema de evaluación de los blastocistos, basado en la evaluación conjunta de estos tres parámetros, ya usado con anterioridad, ha demostrado que proporciona una buena selección embrionaria. Lo que se traduce en mayores tasas de implantación (ASEBIR, 2008; Machtinger y Racowsky, 2013; ASEBIR, 2015).

De igual forma, ASEBIR propone una clasificación de los blastocistos que combina el estadio de evolución, la calidad de la MCI y la del TE en cuatro categorías: A, B, C y D, en función del potencial implantatorio esperado, tal y como se ha descrito con anterioridad. Sin embargo, mientras que en la clasificación propuesta en 2008 confiere el mismo peso a las valoraciones de la MCI y del TE (ASEBIR, 2008), la nueva clasificación otorga una mayor relevancia a la morfología de la MCI respecto a la del TE (ASEBIR, 2015).



**Figura 4.** Fases del desarrollo embrionario avanzado en cultivo *in vitro*. **A)** mórula compacta (MC); **B)** blastocisto temprano (BT); **C)** blastocisto cavitado o en expansión (BC); **D)** blastocisto expandido (BE); y **E)** blastocisto en eclosión o en fase de hatching (BHi).

En resumidas cuentas, durante los últimos años, las tasas de éxito obtenidas en los tratamientos de fecundación *in vitro* han mejorado considerablemente. Sin embargo, la capacidad de identificar el embrión más viable de la cohorte sigue siendo un reto. Hasta la fecha se han desarrollado distintas tecnologías no invasivas para la evaluación de los embriones humanos, sin embargo, no se ha demostrado

que ninguna de ellas sea más efectiva que la evaluación morfológica estándar (Machtiger y Racowsky, 2013). Por lo que la búsqueda de biomarcadores que ayuden a predecir tanto el desarrollo embrionario, como el resultado de los tratamientos de fecundación *in vitro* sigue siendo un punto clave en la investigación para la mejora de las TRA (Meseguer *et al.*, 2011).

## 2. Infertilidad masculina

Dado que el factor masculino representa aproximadamente la mitad de los casos de infertilidad, el estudio del varón supone una parte esencial en el análisis de la pareja estéril. Sin embargo, con el desarrollo de las TRA, y en concreto con la aparición de la técnica de la ICSI, el papel masculino quedó relegado a un segundo plano (Lewis, 2007). No obstante, con el paso del tiempo y tras las observaciones de los resultados de estas técnicas, esta ideología ha ido cambiando, otorgando al factor masculino, y especialmente a las características espermáticas, la importancia que merecen (Kruger *et al.*, 1988; Chan *et al.*, 1993; Grow *et al.*, 1994; Tesarik *et al.*, 2004).

La fertilidad masculina, o capacidad por parte del varón de engendrar un hijo, puede verse afectada como resultado de la acción de varios factores. Así, fallos durante la espermatogénesis o durante la adquisición de la capacidad fecundante producen espermatozoides no funcionales o de baja calidad y por tanto infertilidad (Toshimori *et al.*, 2004). Además, cambios congénitos o adquiridos en el tracto urogenital, infecciones y distintos factores endocrinos, genéticos e inmunológicos pueden ser los causantes de la incapacidad del varón para tener descendencia (Benvold, 1989; Khorram *et al.*, 2001). Por lo que estas causas deben ser examinadas y evaluadas, con el fin de conseguir un correcto diagnóstico del origen de la infertilidad (Sharlip *et al.*, 2002; Dohle *et al.*, 2005; Matorras y Hernández, 2007).

El estudio de la infertilidad masculina debe incluir, de acuerdo a las directrices de la OMS, una historia médica completa, un examen físico y dos análisis seminales, también llamados espermiogramas o seminogramas, de forma que se pueda diagnosticar el factor causante de la esterilidad y, si es posible, tratarlo (OMS, 2010). Es importante remarcar, que aunque el varón tenga una historia previa de fertilidad, no excluye la posibilidad de que haya sufrido alguna alteración que le provoque infertilidad, tratándose en este caso de una infertilidad secundaria. De hecho, los varones que presentan una esterilidad secundaria deben ser evaluados de la misma manera que los hombres que presentan infertilidad primaria (Dohle *et al.*, 2005).

## 2.1. Causas de la infertilidad masculina

La infertilidad masculina puede estar causada por diversos factores o alteraciones, tanto congénitas como adquiridas, que se pueden presentar en distintas localizaciones del sistema reproductor, sistema nervioso central o incluso a nivel sistémico (Tabla 3). Se estima que alrededor del 30%, de los casos de infertilidad masculina, se deben a patologías de origen genético, el 50% a causas no genéticas y el otro 20% son de origen idiopático (Khorram *et al.*, 2001).

Un factor que genera mucha controversia es la influencia de la edad del varón. La edad paterna avanzada se ha relacionado con un empeoramiento de los parámetros seminales de volumen, movilidad, concentración y porcentaje de formas normales (Auger y Jouannet, 2005; Slotter *et al.*, 2006). Por otra parte, también se ha relacionado con la integridad del DNA de los espermatozoides, como mutaciones de novo o alteraciones en la impronta de algunos genes (Zhu *et al.*, 2005; Bellver, 2008). Aún así, algunos autores defienden que este empeoramiento de la calidad seminal no afectaría negativamente a la consecución de un embarazo, por lo que no debería usarse como factor pronóstico en las TRA (Bellver, 2008).

**Causas de infertilidad masculina**

**1. Alteraciones hipotalámico-hipofisarias o pre-gonadales**

Congénitas	Deficiencias congénitas de GnRH Hemocromatosis Desórdenes genéticos multiorgánicos (Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Laurence-Moon-Beild, ataxia cerebral familiar)
Adquiridas	Tumores de la glándula pituitaria y el hipotálamo Desórdenes infiltrativos (sarcoïdosis, histiocitosis, tuberculosis, infecciones fúngicas) Traumatismos, post-cirugía o post-irradiación Problemas vasculares (infartos o aneurismas), Alteraciones hormonales (hiperprolactinemia, exceso de andrógenos, exceso de estrógenos y exceso de corticoides), Drogas (opioides, drogas psicoactivas, agonistas o antagonistas de la GnRH)
Sistémicas	Enfermedades crónicas Deficiencias nutricionales Obesidad

**2. Alteraciones gonadales primarias o desórdenes gonadales**

Congénitas	Criptorquidia Distrofia miotónica Anorquia congénita Varicocele Síndromes de insensibilidad androgénica Deficiencias de la 5- $\alpha$ -reductasa (tipo 2) Síndrome de Klinefelter (XXY) y sus variantes (XXY/XY; XXXY) Microdelecciones del cromosoma Y
Adquiridas	Orquitis (debidas a agentes virales) Orquitis granulomatosas (debidas a tuberculosis y lepra) Orquitis epididimarias (debidas a gonorrea y clamidia) Drogas (drogas citotóxicas, agentes alcalinizantes, antiandrógenos, ketokonazol, espirolactona, agonistas del receptor de la histamina, alcohol, marihuana) Radiaciones ionizantes Toxinas ambientales (cadmio, plomo, estrógenos ambientales, fitoestrógenos) Hipertermia Inmunológicas, incluida la enfermedad autoinmune poli-glandular Traumatismos Torsiones Castración Enfermedades sistémicas (fallo renal, cirrosis hepática, cáncer, vasculitis, amiloidosis)

**3. Alteraciones en el transporte de los espermatozoides o desórdenes post-testiculares**

Disfunciones del epidídimo	Drogas Infecciones
Anormalidades de los vasos deferentes	Ausencia congénita de los conductos deferentes Síndrome de Young Infecciones Vasectomías
Disfunción eyaculatoria	Enfermedades de la médula espinal Disfunción de la autonomía Eyaculación precoz

**4. Infertilidad masculina inexplicada o idiopática**

**Tabla 3.** Causas de la infertilidad masculina en función del compartimento anatómico en el que se localizan. Modificado de Khorram *et al.*, 2001.

## 2.2. Estudio inicial de la infertilidad masculina

La evaluación inicial de la esterilidad masculina debe incluir (Dohle *et al.*, 2005; Matorras y Hernández, 2007):

### 1) Historia médica o anamnesis completa

- Antecedentes de interés andrológico (gestación y parto propio, desarrollo y pubertad, historia genitourinaria, existencia de patologías de riesgo).
- Historia reproductiva (duración infertilidad, gestaciones producidas, función sexual).
- Enfermedades generales relevantes.
- Exposición a factores con efecto negativo sobre la fertilidad (medicamentos, laborales, estilo de vida).
- Historia familiar, incluyendo número de hermanos, antecedentes de infertilidad, fibrosis quística, hipogonadismo, criptorquidia y azoospermia en hermanos varones.

### 2) Exploración física

- Hábito somático, datos antropométricos y caracteres sexuales secundarios.
- Genitales externos: pene, región inguinal, escroto, testículos, epidídimo, conductos deferentes o cordones espermáticos, incluyendo plexo venoso.
- Tacto rectal para exploración prostática.

### 3) Análisis del semen

El análisis del semen indica el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y orienta a cerca de patologías del tracto genital. De forma que aunque los resultados no permiten determinar con certeza si un individuo es fértil o no, puede proporcionar información acerca de problemas en los órganos genitales del varón (Matorras y Hernández, 2007). Como ya se ha comentado anteriormente, se deben realizar, al menos, dos seminogramas (a ser posible realizados por lo menos con un mes de diferencia) para establecer el perfil basal del paciente. Éstos, deben ser realizados y valorados según los métodos y criterios descritos por la OMS (OMS, 2010).

Dependiendo de los resultados obtenidos en este estudio inicial de la infertilidad masculina (como la observación de algún antecedente en la anamnesis o resultado patológico del espermiograma), se pueden solicitar una serie de pruebas complementarias y/o estudios genéticos. Las pruebas complementarias que se pueden realizar son: pruebas de función espermática, ecografía y ultrasonografía doppler escrotal, ecografía transrectal, el estudio bacteriológico del semen y el análisis de orina post-orgasmo. En cuanto a los estudios genéticos, se pueden determinar: el cariotipo, microdeleciones del cromosoma Y, mutaciones del gen CFTR (gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística) y el estudio de los cromosomas meióticos (Matorras y Hernández, 2007).

### 2.3. El espermiograma

El propósito principal de un espermiograma, consiste en evaluar los parámetros clásicos de un eyaculado producido por masturbación. Este análisis, como ya se ha expuesto, puede proporcionar información esencial del estado clínico del varón y, además, puede ayudar a dilucidar las posibles causas de la infertilidad. Estas razones hacen que actualmente, el análisis de semen sea la única herramienta básica de rutina utilizada para evaluar la infertilidad masculina, aunque como se explica más adelante, presenta ciertas limitaciones en la determinación del potencial fértil del varón (Polansky y Lamb, 1988; Guzick *et al.*, 2001; Garrido *et al.*, 2008; Samplaski *et al.*, 2010).

El espermiograma se basa en la evaluación macroscópica y microscópica de las características del eyaculado. Las características macroscópicas que se deben analizar en el semen en fresco son: el aspecto, la licuefacción, la viscosidad, el pH, el volumen y el olor. En cuanto al examen microscópico de la muestra, se valora la concentración espermática, la movilidad, la morfología así como la estimación de la aglutinación o agregación, y la presencia de otros elementos celulares, como leucocitos o células germinales inmaduras, y detritos (Matorras y Hernández, 2007; OMS, 2010).

Las características de estos parámetros, así como los procedimientos para su determinación han ido variando y evolucionando con el tiempo (Garrido, 2014). Actualmente se siguen las directrices establecidas en el quinto manual de laboratorio para el examen y procesado del semen, “WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. WHO, 2010” (OMS, 2010). En la tabla 4 se muestran los valores de referencia establecidos en este último manual, para los distintos parámetros seminales.

Valores de referencia	
Parámetro seminal	Valor
Volumen seminal	1,5
Número total de espermatozoides (millones en el eyaculado)	39
Concentración (millones por mililitro)	15
Movilidad total (PR+NP, %)	40
Movilidad progresiva (PR, %)	32
Vitalidad (espermatozoides vivos, %)	58
Número de formas anormales (%)	4

**Tabla 4.** Valores mínimos de los distintos parámetros seminales, establecidos por la OMS. Modificado de OMS, 2010.

En referencia a los resultados observados en el espermiograma, existe una nomenclatura establecida en función de la calidad seminal, que además define las distintas patologías seminales relacionadas con la infertilidad masculina (Tabla 5).

### Nomenclatura relacionada a la calidad seminal

Término	Definición
Aspermia	Ausencia de semen (no hay o se trata de una eyaculación retrógrada)
Hipospermia	Volumen de eyaculado por debajo del valor mínimo de referencia
Astenozoospermia	Porcentaje espermatozoides con movilidad progresiva (PR) por debajo del valor mínimo de referencia
Astenoteratozoospermia	Porcentaje espermatozoides con movilidad progresiva (PR) y morfología normal por debajo de los valores mínimos de referencia
Azoospermia	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado
Criptozoospermia	Ausencia de espermatozoides en preparaciones en fresco, pero que se observan en el pellet tras la centrifugación
Necrozoospermia	Bajo porcentaje de espermatozoide vivos, y presencia de muchos espermatozoides inmóviles en el eyaculado
Normozoospermia	Número total de espermatozoides por debajo del valor mínimo de referencia
Oligoastenozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentaje de movilidad progresiva (PR) por debajo de los valores mínimos de referencia
Oligoastenoteratozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentajes de movilidad progresiva (PR) y morfología normal por debajo de los valores mínimos de referencia
Oligoteratozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentaje de morfología normal por debajo de los valores mínimos de referencia
Oligozoospermia	Número total de espermatozoides por debajo del valor mínimo de referencia
Teratozoospermia	Porcentaje espermatozoides con morfología normal por debajo de los valores mínimos de referencia

**Tabla 5.** Nomenclatura de las distintas patologías en función de las características seminales, establecidas por la OMS. Modificado de OMS, 2010.

El análisis clásico del semen es, por tanto, una técnica económica, sencilla y bastante informativa, que resulta de gran utilidad para determinar la necesidad de realizar de otras pruebas complementarias para la búsqueda de la causa de la infertilidad, así como sobre el tratamiento más adecuado (Sharlip *et al.*, 2002; Alamá y Remohí, 2011). Estos tratamientos pueden ser farmacológicos, quirúrgicos o de fecundación *in vitro*, y tienen como objetivo la consecución de la gestación, e incluso evitar la concepción de individuos con problemas médicos, como alteraciones genéticas (Sharlip *et al.*, 2002). Sin embargo, y como ya se ha comentado, el seminograma, posee una capacidad tanto diagnóstica, como pronóstica reducida para la evaluación del potencial fértil del varón (Guzick *et al.*, 2001; Lewis, 2007; Garrido *et al.*, 2008).

El diagnóstico del varón como fértil o infértil es extremadamente difícil, ya que este estado puede variar en un corto espacio de tiempo e incluso puede cambiar con diferentes parejas (Lewis, 2007; Garrido *et al.*, 2008). Pero quizás la razón más evidente, es la falta de valor predictivo que el espermiograma tiene sobre la consecución de embarazo, tanto *in vivo* como *in vitro*, con las diferentes TRA. De hecho, un análisis de semen que esté dentro de los parámetros normales no implica necesariamente la consecución de una gestación. Esto quedó demostrado en varios trabajos que mostraban como pacientes con diagnósticos de infertilidad presentaban parámetros seminales normales de movilidad, concentración y morfología, mientras que otros varones de fertilidad probada, presentaban seminogramas anormales (Polansky y Lamb, 1988; Guzick *et al.*, 2001; Nallella *et al.*, 2006).

Esta limitada capacidad diagnóstica, también puede deberse, a que este análisis sólo se basa en características como cantidad o movilidad de los espermatozoides presentes en la muestra, dejando a un lado otras características menos visibles, como las moléculas presentes en ellos (Govindaraju *et al.*, 2012; Payan-Carreira *et al.*, 2013). El hecho de no tener en cuenta las características moleculares de los espermatozoides, podría suponer un factor limitante en el potencial diagnóstico del análisis del semen para la valoración de la fertilidad del varón (Sánchez *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta todos estos datos, es lógico pensar que el estudio de las características moleculares espermáticas podrían ayudar a determinar marcadores moleculares de infertilidad masculina. Estos marcadores podrían complementar los análisis actuales de forma que se pudiese mejorar el tratamiento de la infertilidad masculina o se pudiesen predecir los resultados de las TRA. Así, los mecanismos fisiológicos y moleculares del espermatozoide, están siendo cada vez mejor caracterizados mediante estudios que demuestran la implicación de diferentes sistemas moleculares en la fisiopatología de la infertilidad masculina (Samplaski *et al.*, 2010; Govindaraju *et al.*, 2012).

### 3. El espermatozoide

En la especie humana existen dos tipos de gametos, el masculino y el femenino, los cuales presentan entre sí, unas diferencias morfológicas muy notables. El gameto femenino u oocito, es una célula altamente especializada y una de las más grandes del organismo, destinada en exclusiva a generar un nuevo individuo. Es la encargada de transmitir los genes maternos, las mitocondrias y toda la maquinaria necesaria para la transcripción durante las primeras etapas embrionarias. Además, también aporta reservas de materiales alimenticios para el crecimiento y desarrollo del embrión y una efectiva envoltura protectora. Por el contrario, el gameto masculino o espermatozoide, es una de las células más pequeñas del organismo y está casi desprovista de estructuras celulares. Se trata de una célula con una morfología muy diferenciada y especializada, siendo extraordinariamente móvil e hidrodinámica (Alberts, 2010). Estas características le confieren velocidad y eficiencia en la fecundación, ambas muy importantes teniendo en cuenta la elevada competencia que existe entre los espermatozoides para lograr la fecundación del oocito (Simmons y Fitzpatrick, 2012). Estas distintas características, hacen que ambos gametos se complementen, propagando los genes que transportan y permitiendo el desarrollo de un nuevo individuo (Alberts, 2010).

Tradicionalmente se pensaba que la única función del espermatozoide era la de transportar el material genético paterno. Hoy día se sabe que además del ácido desoxirribonucleico (DNA), también aporta el centriolo, proteínas y ácidos ribonucleicos (RNAs) que influyen tanto en el proceso de fecundación, como en el desarrollo del futuro embrión. El centriolo es una estructura que no está presente en los oocitos humanos, ya que lo adquieren durante el proceso de fecundación (Alberts, 2010). Además, el espermatozoide también cede al oocito un conjunto de proteínas y moléculas de señalización, que contribuyen tanto en el proceso de activación oocitaria como en los estadios tempranos del desarrollo pronuclear y del desarrollo embrionario (Mujica *et al.*, 2003; Sutovsky *et al.*, 1999). Por otra parte, durante las últimas décadas, se ha descubierto que el espermatozoide también aporta al oocito su propio pool de transcritos. Sugiriéndose, cada vez con más fuerza, que ese conjunto de RNAs tendría distintas funciones, desempeñando un papel muy importante en la fecundación, siendo traducido por el cigoto, contribuyendo en las primeras divisiones embrionarias, o silenciando distintos ARNm de origen materno (Jodar *et al.*, 2013; Miller y Ostermeier, 2006a; Krawetz, 2005a; Krawetz, 2005b).

### 3.1. Estructura del espermatozoide humano

El espermatozoide se diferencia en dos regiones, morfológica y funcionalmente distintas. Las cuales, están limitadas por una única membrana plasmática, y unidas mediante la pieza de conexión (Figura 5). Estas regiones son: 1) la cabeza, formada por una vesícula secretora muy especializada y el núcleo celular, donde reside la información genética, condensado y revestido tan sólo de una fina capa de citoplasma y de membrana celular; y 2) la cola o flagelo, que es una estructura altamente definida, que confiere movimiento al espermatozoide, de forma que le impulsa hacia el oocito y le ayuda a atravesar la cubierta oocitaria (Kierszenbaum y Tres, 2012).

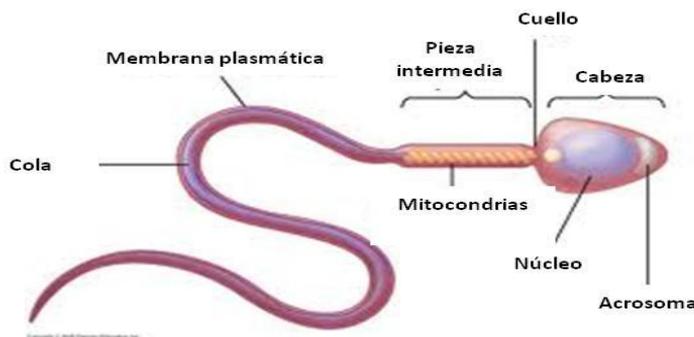


Figura 5. Morfología de un espermatozoide humano maduro.

Concretamente, **la cabeza** del espermatozoide humano tiene una forma ligeramente ovalada con un contorno regular (OMS, 2010). En su interior contiene un par de estructuras funcionalmente muy importantes para el espermatozoide, el material genético y el acrosoma. El DNA del núcleo está fuertemente empaquetado, visualizándose como una estructura muy condensada y aplanada (Kierszenbaum y Tres, 2012). Para lograr este grado de condensación, los cromosomas de los espermatozoides en vez de contener histonas, propias de las células somáticas, presentan unas proteínas de elevada carga positiva llamadas protaminas, así como histonas espermáticas específicas (Govin *et al.*, 2004). Esto permite que el volumen del núcleo quede reducido al mínimo, facilitando su transporte e impidiendo la transcripción (Kierszenbaum y Tres, 2012). La otra gran

estructura presente en la cabeza, es una vesícula secretora muy especializada, denominada vesícula acrosómica o acrosoma. El acrosoma se encuentra en estrecha aposición con la parte anterior de la envoltura nuclear, estando anclado a ella mediante una lámina de citoesqueleto, denominada acroplaxoma. Esta vesícula contiene enzimas hidrolíticas (proteasas, fosfatasa ácida, hialuronidasa y neuraminidasa, entre otras), que suelen encontrarse en los lisosomas. Es por ello que se le suele considerar un tipo especial de lisosoma (Abou-Haila y Tulsiani, 2000). Las enzimas acrosómicas se liberan por exocitosis, en el momento de la fecundación para facilitar que el espermatozoide atraviese la corona radiada y la zona pelúcida que rodean al oocito. La liberación del contenido del acrosoma es lo que se denomina *reacción acrosómica*, que es necesaria para la penetración del espermatozoide en el oocito y su fecundación (Kierszenbaum y Tres, 2012).

La pieza de conexión entre la cabeza y la cola, también denominada cuello, 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).

Finalmente, **la cola o flagelo**, se subdivide en tres segmentos: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza final. La pieza intermedia está formada por tres elementos, una vaina de mitocondrias dispuestas en hélice, el axonema, y nueve columnas longitudinales llamadas fibras densas externas, que se proyectan por la cola a partir de la pieza de conexión en el cuello del espermatozoide. Las mitocondrias son las responsables de generar energía en forma de adenosin trifosfato (ATP), necesaria para el correcto funcionamiento del espermatozoide. La pieza principal es el segmento más largo de la cola. Está constituida por un axonema central rodeado de siete fibras densas y una vaina fibrosa. Las fibras densas externas son rígidas, de forma que protegen al flagelo de posibles roturas. Además, aunque *a priori*, parecen reducir la flexibilidad del flagelo, aportan el patrón de movimiento ondulatorio característico de la cola del espermatozoide. Por su parte, la vaina fibrosa está formada por unas costillas concéntricas que se proyectan desde unas columnas longitudinales equidistantes. El último segmento es la pieza final, que corresponde a una fracción muy corta de la cola en el cual sólo se encuentra el axonema (Kierszenbaum y Tres, 2012).

### 3.2. Espermatogénesis

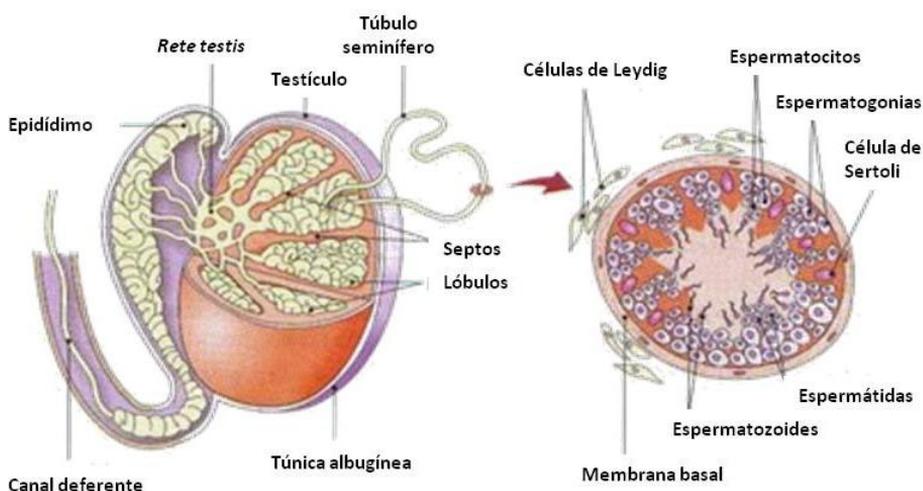
Los espermatozoides se producen mediante un proceso de diferenciación celular llamado espermatogénesis, cuyo resultado es la formación de células haploides (contienen la mitad de la información genética) altamente especializadas a partir de células madre de la línea germinal (Clermont, 1972). Este proceso tiene una duración de entre 65 y 75 días. Se inicia en la pubertad y se mantiene durante el resto de la vida, aunque disminuye notablemente en la vejez (Kierszenbaum y Tres, 2012).

La formación de los espermatozoides tiene lugar testículos, concretamente en los túbulos seminíferos (Figura 6). Entre el 60-80% del volumen testicular corresponde a los túbulos seminíferos. El testículo humano está dividido por unos tabiques de conjuntivo en unos 250-300 lobulillos con forma cónica. Dentro de cada lobulillo se sitúan entre tres y cuatro túbulos seminíferos, de una longitud de hasta 70 cm y unas 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estos conductos están constituidos por una luz central revestida del epitelio seminífero (Kierszenbaum y Tres, 2012).

El epitelio seminífero, es un tipo de tejido muy especializado que está formado por dos poblaciones celulares distintas, las células espermatogénicas y las células de Sertoli. Éstas últimas presentan una localización basal, estando además distribuidas entre las células espermatogénicas, aportándoles un apoyo nutricional y funcional, imprescindible para la correcta formación y desarrollo de los espermatozoides. Una característica muy importante de las células de Sertoli es la existencia de unas uniones herméticas basales entre ellas. Estas uniones desempeñan dos funciones distintas, por un lado dividen el epitelio seminífero en dos compartimentos, basal y adluminal, y por otro lado forman la barrera hematotesticular. Esta barrera impide, que las proteínas, incluidos los anticuerpos, contacten con las células espermatogénicas en desarrollo, y por otra parte, que las proteínas provenientes de estas células espermatogénicas, se liberen al exterior de los tubúlos seminíferos y desencadenen una respuesta inmunitaria. Además, las células de Sertoli, se encargan de sintetizar y secretar diversas sustancias que se liberan en la luz del túbulo como parte del fluido testicular, o que pasan a la circulación sanguínea (Ogawa *et al.*, 2005).

El otro tipo celular que nos encontramos dentro de los túbulos seminíferos son las células espermatogénicas. Éstas se corresponden con la población de células germinales masculinas en distintas etapas de maduración (espermatogonias,

espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides). Las células espermatoгénicas adoptan una disposición estratificada en función del estadio madurativo en el que se encuentran. De forma que las menos evolucionadas, las espermatoгонias, están en contacto con la lámina basal mientras que las más evolucionadas, las espermátidas y espermatozoides, están situadas más próximas a la luz del túbulo. Una vez que los espermatozoides han completado su morfogénesis, son liberados a la luz del túbulo seminífero (Clermont, 1972).



**Figura 6.** Dibujo esquemático de la morfología y disposición del testículo humano y del epidídimo. Sección transversal de un túbulo seminífero humano y la disposición de las células somáticas y espermatoгénicas.

Los túbulos seminíferos están orientados hacia la misma dirección, desembocando en una red de conductos llamada *rete testis*. La *rete testis* está formada por una serie de canales anastomosados, de forma irregular, y está unida con el epidídimo a través de unos 12-20 conductos eferentes. El epidídimo es un túbulo muy contorneado de unos 4-6 cm de longitud. En él, los espermatozoides se almacenan y maduran, es decir, adquieren un patrón de movilidad anterógrada. Sin embargo, los espermatozoides almacenados en este punto, siguen sin estar en condiciones para fecundar el oocito, ya tienen que terminar de madurar. Este proceso de maduración post-testicular, que tiene lugar en el tracto genital femenino, es esencial para la adquisición de la capacidad fecundante (Kierszenbaum y Tres, 2012).

El proceso de espermatogénesis se puede dividir en tres fases, la fase mitótica, la fase meiótica y por último la espermiogénesis (Clermont, 1972; Kierszenbaum y Tres, 2012).

### 3.2.1. Fase mitótica

Durante la formación del embrión, las células germinales primordiales emigran hacia los testículos y se convierten en células germinales inmaduras llamadas **espermatogonias**. Éstas constituyen el estrato basal del epitelio seminífero, ya que se localizan alrededor del límite externo de los túbulos seminíferos junto a la lámina basal. Esta primera fase comienza en la pubertad, y en ella las espermatogonias proliferan mediante mitosis y se diferencian en espermatocitos. Las células germinales inmaduras o espermatogonias, son células que contienen la información genética por duplicado (diploides o  $2n$ ). En el testículo humano, existen dos tipos fundamentales de espermatogonias: las espermatogonias de tipo A ( $46, 2n$ ), que sufren un número limitado de divisiones mitóticas, de forma que mantienen la población; y las espermatogonias de tipo B ( $46, 2n$ ), procedentes de la división mitótica de las anteriores, que emprenden el proceso de meiosis (Clermont, 1972; Kierszenbaum y Tres, 2012).

### 3.2.2. Fase meiótica

La fase meiótica se corresponde con la etapa en la que tiene lugar la reducción del contenido genético a la mitad, de forma que las células pasan de ser diploides ( $2n$ ) a ser haploides ( $n$ ). Además, en esta etapa tiene lugar la recombinación entre cromosomas homólogos, que origina que todos los espermatozoides producidos por el varón contengan diferentes combinaciones génicas, aumentando así la variabilidad genética (Clermont, 1972; Kierszenbaum y Tres, 2012).

Esta etapa comienza cuando las espermatogonias de tipo B, entran en la primera división meiótica y replican su DNA, pasando a ser **espermatoцитos primarios** ( $46, 4N$ ). Estos espermatoцитos continúan con la meiosis, de forma que cuando termina la primera división meiotica se han producido dos **espermatoцитos secundarios** ( $23, 2n$ ). Estos avanzan en el proceso de meiosis entrando en la segunda división meiótica, en la que se reduce la carga genética a la mitad, dando lugar a la formación de dos **espermátidas redondas** haploides ( $23, 1n$ ). De forma que por cada espermatogonia que comienza esta fase, se producen cuatro espermátidas redondas (Clermont, 1972; Kierszenbaum y Tres, 2012).

### 3.2.3. Espermiogénesis

La última fase, llamada espermiogénesis, se caracteriza por una compleja morfogénesis a través de la cual las espermatidas redondas o precoces se diferencian, primero en **espermatidas alargadas** o tardías, y finalmente, en espermatozoides. Las espermatidas redondas inician una nueva mitosis, dando origen cada uno de ellos a dos espermatidas más alargadas, situadas ya muy próximas a la luz del túbulo. Estas sufren una serie de modificaciones que consisten en: 1) el desarrollo del flagelo a partir del centriolo distal; 2) el desarrollo del acrosoma a partir de aparato de Golgi, que se corresponde con la síntesis y almacenamiento progresivo de enzimas hidrolíticas en el saco acrosómico; 3) el desarrollo del manguito o *manchette*, estructura compuesto por un anillo perinuclear y microtúbulos, que resulta esencial para el transporte de vesículas o balsas de proteínas durante la morfogénesis del espermatozoide; y 4) la condensación nuclear (Kierszenbaum y Tres, 2012).

Tras haberse completado la espermiogénesis, durante la fase final de maduración de la espermatidas, las mitocondrias completan su alineamiento, el manguito migra en dirección caudal y se desensambla, el núcleo se alarga y condensa, y el citoplasma sobrante de las espermatidas, denominado cuerpo residual, es fagocitado por las células de Sertoli (Kierszenbaum y Tres, 2012).

El **espermatozoide**, ya formado, es liberado a la luz del túbulo mediante un proceso dirigido por las células de Sertoli denominado **espermiación**. Se calcula que diariamente, en condiciones normales, se liberan a la luz de los túbulos seminíferos más de 180 millones de espermatozoides (Clermont, 1972).

Una característica importante de la espermatogénesis es que cuando una espermatogonia ha empezado el proceso de maduración, las células de su descendencia no completan la división citoplasmática (citocinesis), ni durante la mitosis ni durante la meiosis. Esto significa que se forman grandes clones de células hijas diferenciadas descendientes de una espermatogonia madura, que permanecen conectadas por puentes citoplasmáticos formando un sincitio. Estos puentes citoplasmáticos se mantienen hasta el final de la diferenciación de los espermatozoides, cuando se produce la espermiación. Este hecho es el responsable de la producción sincrónica de espermatozoides maduros en cualquier área del tubo seminífero (Kierszenbaum y Tres, 2012).

### 3.3. Maduración post-testicular

Los espermatozoides presentes en los túbulos seminíferos y en las primeras porciones del epidídimo son inmóviles e incapaces de fecundar un oocito. Sin embargo, tras haber permanecido en el epidídimo entre 18 y 24 horas, obtienen la capacidad de movilidad (Amann y Howards, 1980). Aun así, diversas proteínas inhibitoras presentes en el líquido del epidídimo impiden el movimiento real hasta después de la eyaculación (Yoshida *et al.*, 2008).

Los espermatozoides tardan varios días en recorrer el epidídimo. A pesar de que cuando abandonan el epidídimo se les considera “maduros”, los espermatozoides eyaculados no son competentes para fecundar el oocito, y necesitan ser modificados por el tracto genital femenino (De Jonde, 2005; Suarez, 2008; Sakkas *et al.*, 2015). Las modificaciones que acontecen en el tracto reproductor femenino se producen de manera secuencial y son: la adquisición de la movilidad, la capacitación, íntimamente unida a la hiperactivación, la reacción acrosómica y por último la fusión de las membranas gaméticas (Austin, 1952; Yoshida *et al.*, 2008).

Como se acaba de describir, la primera modificación que sufren los espermatozoides consiste en la **adquisición de la movilidad progresiva**, la cual tiene lugar en el útero femenino. El espermatozoide adquiere esta movilidad mediante una serie de cambios en las condiciones ambientales, tales como variaciones en las concentraciones osmótica e iónicas, y en respuesta a factores liberados por el oocito y que resultan esenciales para la fecundación del mismo (Yoshida *et al.*, 2008).

Una vez se ha adquirido la movilidad, se produce la **capacitación** espermática, proceso que acontece en las trompas de Falopio. La capacitación es un proceso reversible que se inicia con la eliminación de factores unidos al espermatozoide, procedentes del plasma seminal, y finaliza cuando el espermatozoide es capaz de responder a los estímulos generados por la zona pelúcida del oocito, que desencadenan la reacción acrosómica (Chang, 1951; Austin, 1952). Este proceso supone cambios bioquímicos y funcionales en los espermatozoides, incluyendo la remodelación de las moléculas de la superficie celular, desestabilizando la membrana plasmática y desencadenando la hiperactivación espermática; lo que prepara al gameto masculino para la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1994; De Jonde, 2005). Además está asociada a: 1) una disminución del número de moléculas de colesterol en la membrana plasmática, 2) un aumento de la

concentración de calcio y adenosin mono-fosfato cíclico (AMPC) intracelular, 3) un aumento del pH citosólico, 4) la fosforilación de las tirosinas de distintas proteínas, 5) variaciones en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) y 6) al desenmascaramiento de receptores de superficie celular que contribuyen a la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida (Visconti y Kopf, 1998; Breitbart, 2002; De Jonde, 2005). *In vivo* el proceso sucede en el tránsito del espermatozoide a través del tracto femenino y termina en el oviducto o trompa de Falopio (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001; De Jonde, 2005; Suarez, 2008; Sakkas *et al.*, 2015). Pero también puede producirse *in vitro* en condiciones de cultivo apropiadas y habitualmente es un requerimiento en los procedimientos de fecundación *in vitro* (Hafez *et al.*, 2004; De Jonde, 2005). La capacitación también se asocia a cambios en los patrones de movimiento de los espermatozoides, fenómeno denominado **hiperactivación** (Yanagimachi, 1970).

La **reacción acrosómica** es un proceso irreversible que acontece tras la capacitación. Como ya se ha comentado, consiste en la exocitosis de la vesícula acrosómica del espermatozoide. Lo que se produce como consecuencia de la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa del espermatozoide y la exposición hacia el exterior de la membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1994; Yoshida *et al.*, 2008). En una primera fase se libera una pequeña cantidad del contenido del acrosoma, lo que permite al espermatozoide atravesar las células de la granulosa que rodean al oocito. Posteriormente, cuando los espermatozoides se unen a la zona pelúcida, mediante proteína ZP3, la membrana exterior del acrosoma se disuelve produciéndose la liberación del resto del contenido acrosómico, de forma que el espermatozoide puede atravesar la zona pelúcida (Yoshida *et al.*, 2008).

Finalmente, una vez que el espermatozoide atraviesa la zona pelúcida y ha sufrido la reacción acrosómica, se provoca una remodelación de la superficie del espermatozoide a nivel del segmento ecuatorial (de Lamirande *et al.*, 1997) y se produce la **interacción entre las membranas plasmáticas de los gametos**. Éstas se fusionan y el material genético del espermatozoide penetra en el oocito para dar lugar a un cigoto totipotente (Yoshida *et al.*, 2008).

Por lo tanto, para poder fecundar al oocito, los espermatozoides deben tener la habilidad de nadar, atravesar el moco cervical y finalmente, encontrar y reconocer el oocito para así poder iniciar tanto la fecundación como los procesos que resultan

en la formación de un embrión (De Jonde, 2005; Yoshida *et al.*, 2008). Durante el desarrollo de todas estas etapas intervienen un gran número de moléculas (Aitken *et al.*, 2007; Suarez, 2008; Rahman *et al.*, 2014), las cuales, podrían ser usadas como biomarcadores de la función espermática.

Hasta la fecha se han relacionado varios de estos componentes espermáticos con la fertilidad/infertilidad masculina. Sin embargo, dados los numerosos procesos por los que atraviesan los espermatozoides hasta que fecundan un oocito, resulta imposible definir un único responsable. Esto hace la infertilidad masculina sea entendida como una situación ocasionada por la combinación de varios de estos factores.

### 4. Marcadores moleculares relacionados con la fertilidad espermática

Como ya se ha explicado, los parámetros clínicos no siempre permiten evaluar el potencial fértil del varón, ya que las causas de la infertilidad no siempre pueden ser observadas en un análisis seminal. En los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios para identificar y comprender los mecanismos moleculares que intervienen en la infertilidad masculina. Fruto de ello, se han descrito y caracterizado diferentes rasgos morfológicos y moleculares de los espermatozoides considerados como esenciales para la obtención de descendencia. Esto ha resultado en el desarrollo de distintas metodologías que permiten una selección objetiva de los mejores espermatozoides para usar en las distintas técnicas de fecundación *in vitro*.

Así, los procesos fisiológicos más estudiados han sido los relacionados con el estrés oxidativo, la apoptosis, la ubiquitinación, la integridad del DNA y distintas moléculas individuales implicadas en la funcionalidad espermática. Al mismo tiempo, esto se ha visto potenciado tanto por los grandes avances tecnológicos, como por el desarrollo de las ciencias “-ómicas”, las cuales se han convertido en valiosas herramientas en el estudio de las características moleculares del espermatozoide. Todo esto, está permitiendo un mayor conocimiento sobre las moléculas implicadas en los procesos biológicos que sufren los espermatozoides y, consecuentemente, sobre su fisiología y fisiopatología.

Sin embargo, sigue siendo necesario un estudio más detallado de todos estos elementos y procesos, para así, por una parte lograr entender su función y 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. Ya que por un lado, estos biomarcadores podrían ser usados como pruebas complementarias al espermiograma, mejorando su poder diagnóstico o pronóstico, y por otro, podrían permitir la selección de los mejores espermatozoides para usar en las TRA.

## 4.1. Métodos actuales de selección objetiva de espermatozoides

Actualmente en las clínicas de reproducción asistida podemos encontrar distintos métodos que permiten una selección objetiva de espermatozoides. Estas técnicas se basan en las características morfológicas y moleculares que presentan los espermatozoides maduros, y que están asociadas con una correcta función celular y con la integridad del DNA espermático (Henkel, 2012). El uso de estos espermatozoides maduros sanos y morfológicamente normales, implicaría una mejora en los resultados de las TRA (Said y Land, 2011; McDowell *et al.*, 2014). Estos métodos de selección objetiva son: 1) el aislamiento de espermatozoides mediante su carga eléctrica, que pueden realizarse en base a la carga eléctrica de su superficie y en base al potencial zeta (potencial eléctrico existente entre la membrana de los espermatozoides y su entorno), 2) la selección celular inmunomagnética para la detección de células apoptóticas (columnas MACS de Anexina V), 3) la selección de espermatozoides maduros en base a su unión al ácido hialurónico mediante dos protocolos similares, PICSITM y SpermSlow, 4) la selección de espermatozoides en base a sus características morfológicas al ser observados en un microscopio de alta magnificación (IMSI), y 5) la selección de espermatozoides que presentan birrefringencia al ser observados en un microscopio de luz polarizada (McDowell *et al.*, 2014).

### 4.1.1. Aislamiento de espermatozoides por su carga eléctrica

Durante la maduración del epidídimo, los espermatozoides humanos sufren distintas modificaciones en la membrana plasmática. Una de estas modificaciones es la adquisición de distintas formas de una sialoglicoproteína unida a lípidos, la gp20/CD52, que además, les confiere carga eléctrica negativa (Ishijima *et al.*, 1991; Henkel, 2012). El nivel de expresión de esta proteína en los espermatozoides parece estar correlacionado positivamente con el porcentaje de espermatozoides con morfología normal, así como con el estado de capacitación espermática y el status fértil del varón (Henkel, 2012). De forma que, este tipo de protocolos permiten una selección, no invasiva, de los espermatozoides maduros y de mejor calidad (Chan *et al.*, 2006; Razavi *et al.*, 2010). Actualmente existen dos procedimientos para separar los espermatozoides en base a su carga eléctrica: 1) la selección de espermatozoides cargados negativamente mediante electroforesis, y 2) la selección en base a su potencial zeta, que como ya se ha expuesto, es el

potencial eléctrico existente entre la membrana de los espermatozoides y su entorno (McDowell *et al.*, 2014; Ishijima *et al.*, 1.991).

El método de selección de espermatozoides mediante ***electroforesis*** se basa en el tamaño y la carga de estas células. El criterio de tamaño asegura que sólo se seleccionan espermatozoides maduros. Mientras que el resto de células presentes en el semen, como leucocitos y células germinales inmaduras, son excluidas debido a su mayor tamaño (Ainsworth *et al.*, 2005; Said y Land, 2011). La existencia de una carga superficial electronegativa, debida a la presencia de sialoglicoproteínas en su membrana (Ishijima *et al.*, 1991), indica que los espermatozoides han finalizado correctamente el proceso de diferenciación, y que por lo tanto serían maduros (Engelmann *et al.*, 1988; Ainsworth *et al.*, 2005). En este procedimiento, el semen es colocado en un dispositivo electroforético al que se aplica una corriente, de forma que los espermatozoides maduros, con carga negativa, se separan rápidamente recogiéndose en una cámara adyacente. La selección electroforética de espermatozoides es un método relativamente rápido (Ainsworth *et al.*, 2005), que además reduce al mínimo el estrés oxidativo al que son sometidos los espermatozoides (Aitken y Clarkson, 1988; Ainsworth *et al.*, 2005). Asimismo, se ha demostrado su eficacia en muestras con bajo recuento espermático, como sémenes oligozoospermicos y muestras de espermatozoides congelados y obtenidos de biopsias testiculares. Sin embargo, la complejidad del aparato de separación puede ser un factor limitante para su uso rutinario en los laboratorios de andrología (Said y Land, 2011).

Igualmente, se ha desarrollado otro método de selección, basado en el ***potencial zeta*** de los espermatozoides (Chan *et al.*, 2006). Para la realización de este método, basta con añadir a un tubo de centrifuga cargado positivamente, espermatozoides previamente lavados. Después de un minuto, se centrifuga y se elimina todo el contenido que no ha quedado adherido al tubo, como espermatozoides inmaduros y/u otros contaminantes. Finalmente, los espermatozoides maduros, cargados negativamente, son recuperados tras adicionar al tubo medio suplementado con suero (Said y Land, 2011). De forma que es un método sencillo, barato, y que no requiere ningún equipamiento instrumental especial. Sin embargo, presenta una serie de limitaciones, como la baja recuperación de espermatozoides, lo que restringe su uso en muestras de varones oligozoospermicos, o el que no haya sido probado con espermatozoides recuperados del testículo o del epidídimo (Chan *et al.*, 2006; Said y Land, 2011).

Aunque se ha comprobado que el uso de estas técnicas mejora la calidad de los espermatozoides recuperados, no se ha demostrado que estos espermatozoides mejoren significativamente los resultados de las TRA (Said y Land, 2011; McDowell *et al.*, 2014).

### **4.1.2. Separación inmunomagnética de espermatozoides mediante columnas de Anexina V**

Las células que van a entrar en un proceso de muerte celular programada, o apoptosis, sufren la translocación de moléculas del fosfolípido fosfatidilserina (PS) a la superficie externa de la membrana plasmática. Una de las características de estos fosfolípidos es que se unen con gran afinidad a la Anexina V (Vermes *et al.*, 1995). Teniendo en cuenta esta característica, se han desarrollado unos dispositivos basados en unas columnas que permiten la separación inmunomagnética de estas células apoptóticas, las columnas MACS® de Anexina V. Así, estas columnas permiten la selección y retención de espermatozoides que presentan PS en su superficie, y por tanto que han comenzado con el proceso de apoptosis. Este método consiste en la incubación de la muestra de espermatozoides con Anexina V, previamente conjugada con moléculas de hierro, para posteriormente ser cargada en una columna a la que se le aplica un campo magnético. De forma que los espermatozoides que presenten moléculas de PS de la superficie, se unirán a la Anexina V y serán retenidos en la matriz de la columna, mientras que el resto de los espermatozoides eluirán a través de la columna. Por lo tanto, este método permite identificar y separar los espermatozoides cuya integridad de membrana y vitalidad no están comprometidas y, consecuentemente, mejora la calidad de los espermatozoides que van a ser usados en las TRA (Grunewald, 2001).

Teóricamente, el uso de estas columnas mejoraría la calidad embrionaria, así como las tasas de fecundación, implantación y gestación, y reduciría las tasas de aborto en base a la obtención de espermatozoides de mejor calidad. Sin embargo, los datos obtenidos en múltiples estudios muestran una gran controversia en estas supuestas mejoras en los resultados de las parejas infértiles (Dirican *et al.*, 2008; Nadalini *et al.*, 2014; Gil *et al.*, 2013; Romany *et al.*, 2014; Said y Land, 2011).

### 4.1.3. Selección de espermatozoides con receptores de ácido hialurónico

Los espermatozoides maduros presentan en su superficie receptores para el ácido hialurónico, lo que está asociado a la remodelación que sufre la membrana plasmática durante la espermiogénesis (Huszar *et al.*, 2007). Este receptor es de suma importancia en la fecundación, ya que hace posible la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida de los oocitos. De igual manera, estos espermatozoides pueden unirse *in vitro* al ácido hialurónico en estado sólido (Cherr *et al.*, 1999). Los espermatozoides con capacidad de unión al ácido hialurónico presentan una serie de características morfológicas, tales como: 1) la ausencia retención anómala de citoplasma, 2) la ausencia de histonas persistentes, 3) la presencia de DNA sin fragmentación, 3) la ausencia de marcadores de apoptosis como la caspasa 3, y 4) la expresión de la chaperona HSPA2, que forma parte del complejo sinaptonémico, y cuya función es dirigir y apoyar la meiosis (Nasr-Esfahani *et al.*, 2008). Además, se ha observado una correlación significativa entre los parámetros seminales básicos (densidad, movilidad y porcentaje de espermatozoides normales) y la capacidad de unión al ácido hialurónico (Ye *et al.*, 2006).

La selección de estos espermatozoides para ICSI mediante esta característica puede llevarse a cabo a través del uso de dos sistemas similares: 1) una placa de microinyección cuya base está impregnada de ácido hialurónico (PICSI™), o 2) un medio de ácido hialurónico que se adiciona en la placa de microinyección (SpermSlow) (Huszar *et al.*, 1997). En lo que se refiere a estos dos procedimientos, actualmente no hay evidencias suficientes que demuestren que tienen distintas eficacias (McDowell *et al.*, 2014). De esta manera, ambos métodos posibilitan la obtención de espermatozoides maduros, no apoptóticos, sin DNA fragmentado y con una menor frecuencia de aneuploidías cromosómicas (Nasr-Esfahani *et al.*, 2008). Asimismo, los resultados obtenidos en múltiples estudios muestran una gran controversia, siendo además insuficientes para demostrar si los espermatozoides seleccionados de esta forma, mejoran los resultados de las TRA, como las tasas de gestación o de recién nacido vivo (RNV) (McDowell *et al.*, 2014).

### 4.1.4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente (IMSI)

La morfología espermática ha sido definida como uno de los factores determinantes de la fertilidad masculina, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kruger y

Coetzee, 1999; Van Waart *et al.*, 2001; van der Merwe *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta esto, se describió un nuevo método de selección de espermatozoides basado en el examen de la morfología de los orgánulos de los espermatozoides móviles conocido como MSOME (motile sperm organelle morphology examination) (Bartoov, 2002). Esta técnica requiere un profundo análisis de la morfología de una serie de orgánulos y estructuras presentes en los espermatozoides, utilizando un microscopio de gran amplificación (más de 6000 aumentos). Los orgánulos o estructuras examinadas son seis: el acrosoma, la lámina postacrosómica, el cuello, las mitocondrias, la cola, y el núcleo. El uso de MSOME en la selección de espermatozoides que van a ser usados para la ICSI, fue denominada como inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente (IMSI) (Bartoov, 2003; Teixeira *et al.*, 2013). Este procedimiento presenta varias ventajas, como la selección de los espermatozoides en tiempo real, sin tinciones que los dañen, con gran magnitud y sin que exista una manipulación prolongada del semen para la separación de los espermatozoides del líquido seminal antes de la microinyección. Sin embargo, es una técnica que requiere equipos especiales, consume mucho tiempo y para la que se necesita mucha experiencia por parte del observador, lo que también implica mayores gastos (Said y Land, 2011).

Desde la introducción de la IMSI, se han desarrollado varios estudios que comparan su eficacia respecto a la ICSI, obteniéndose resultados controvertidos. Aunque se ha observado una mejora de la tasas embarazo clínico y de RNV, así como una disminución de las tasas de aborto, estos resultados no proceden de evidencias sólidas y robustas. Por lo que resultan necesarios más estudios que permitan comprobar de una forma fiable estos efectos (Teixeira *et al.*, 2013; La Sala *et al.*, 2015).

#### **4.1.5. Selección de espermatozoides birrefringentes**

La birrefringencia es una característica intrínseca de los espermatozoides maduros, que se debe fundamentalmente a organización longitudinal de los filamentos proteicos subacrosomales presentes en la cabeza espermática (Baccetti, 2004; Vermey *et al.*, 2015). Esta birrefringencia refleja el buen estado de salud de los espermatozoides y está asociada a una mayor calidad seminal. Por una parte se ha observado que la proporción de espermatozoides birrefringentes es menor en muestras patológicas y en las muestras de espermatozoides testiculares; y por otra parte, la birrefringencia espermática, se correlaciona significativamente con

distintos parámetros seminales básicos como la concentración, la movilidad y la viabilidad. De la misma forma, se ha observado que cuanto más birrefringencia muestran los espermatozoides, poseen un menor porcentaje de aneuploidias cromosómicas (Gianaroli *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta esta característica, se desarrolló un sistema óptico basado en la luz polarizada, que permite la identificación y selección de espermatozoides birrefringentes. Éste constituye un método no invasivo, que permite seleccionar espermatozoides maduros para la ICSI, sin afectar a su viabilidad y movilidad (Gianaroli *et al.*, 2008). Sin embargo, la selección de espermatozoides mediante microscopía polarizada requiere de una instrumentación adicional, así como más tiempo y experiencia técnica (Said y Land, 2011). El uso de espermatozoides birrefringentes en pacientes con factor masculino severo mejora las tasas de implantación, de embarazo clínico y de gestación evolutiva, aunque no se observa ningún efecto sobre las tasas de fecundación y el ritmo de división embrionaria (Vermeij *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta estos datos, el análisis de la birrefringencia en la cabeza del espermatozoide podría representar tanto una herramienta diagnóstica como un nuevo método para la selección espermática aplicable en los laboratorios de fecundación *in vitro* (Gianaroli *et al.*, 2008; Vermeij *et al.*, 2015). No obstante, a pesar de que se ha observado una mejora de los resultados, se necesitan más evidencias sólidas que justifiquen la implementación de esta técnica de forma rutinaria en los laboratorios de reproducción asistida (McDowell *et al.*, 2014).

Aunque estos métodos de selección objetiva de espermatozoides suponen un avance para la mejora de los tratamientos de fecundación *in vitro*, las desventajas de algunas de estas técnicas (equipamiento instrumental, gran experiencia o tiempo de realización), así como los resultados de los estudios llevados a cabo para comprobar su eficacia, hacen que a día de hoy, la aplicación rutinaria de estas metodologías resulte algo controvertida. Así, diversos autores reflejan la necesidad de realizar estudios clínicos más robustos que avalen de forma más contundente el uso de estas técnicas de selección espermática en la práctica clínica diaria (Said y Land, 2011; Teixeira *et al.*, 2013; McDowell *et al.*, 2014).

## 4.2. Marcadores moleculares de infertilidad masculina

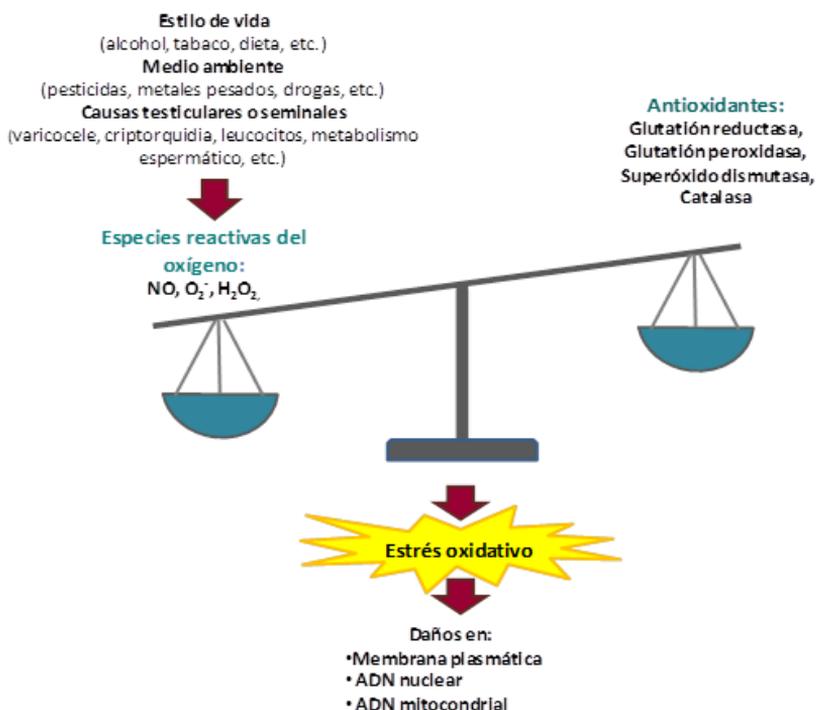
A lo largo de los años se han ido realizando diversos estudios cuyo objetivo es profundizar en el conocimiento sobre las moléculas implicadas en la fisiología y fisiopatología espermática y así poder diagnosticar o predecir el potencial fértil de un varón o la capacidad fecundante de un eyaculado. Siendo los procesos más estudiados los relacionados con el estrés oxidativo, la apoptosis, la integridad del ADN, y distintos factores moleculares individuales. Para lo cual, además de realizar diversos estudios básicos y clínicos, basados en técnicas clásicas de biología molecular, se están aplicando las ciencias “-ómicas” como unas nuevas herramientas para determinar estos marcadores moleculares.

### 4.2.1. Marcadores de estrés oxidativo

En la regulación de la fisiología del espermatozoide, el mantener de unos adecuados niveles de elementos oxidantes resulta esencial, ya que dichos elementos están implicados en procesos como la adquisición del potencial fecundante, la capacitación y la fusión con el oocito (Garrido *et al.*, 2008). Sin embargo, un desequilibrio entre la producción o exposición excesiva a elementos oxidantes y/o a la deficiencia de sustancias antioxidantes, origina estrés oxidativo (EO), que es una de las causas más importantes de mal funcionamiento de los gametos masculinos (Agarwal *et al.*, 2014; Lee y Foo, 2014) (Figura 7).

Los elementos oxidantes están formados principalmente por las ROS, las cuales son productos derivados del metabolismo celular aerobio, que forman parte de un conjunto de moléculas conocidas como radicales libres (RL). Estos RL tienen en común la presencia de uno o más electrones desapareados, lo que hace que actúen como agentes oxidantes altamente reactivos. Entre estos RL se encuentran el anión superóxido ( $O^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el óxido nítrico (NO). Pero además, existen otras moléculas como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que aunque no es un RL, actúa como tal (Agarwal *et al.*, 2014). En la otra parte de la balanza están los mecanismos antioxidantes, encargados de proteger a las células de los efectos producidos por los RL. Estos elementos antioxidantes se pueden dividir en mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Agarwal *et al.*, 2014). Los espermatozoides, debido al escaso espacio citoplasmático, presentan una baja protección antioxidante. Así, estas células poseen unos niveles muy bajos de enzimas antioxidantes citoplasmáticas tales como glutatión peroxidasa (GPx),

glutación reductasa (GR), catalasa y superóxido dismutasa (SOD) (Aitken y koppers, 2011). La escasez de capacidad antioxidante espermática está compensada con distintos componentes presentes en el líquido seminal. Ya que este fluido contiene distintos elementos antioxidantes proporcionados por las secreciones del tracto reproductivo masculino, como la vitamina C, el ácido úrico, el triptófano y la taurina (Moustafa *et al.*, 2004; Aitken y koppers, 2011).



**Figura 7.** Esquema de la producción de estrés oxidativo en los espermatozoides por desequilibrio entre los elementos oxidantes y los mecanismos antioxidantes. Modificado de Agarwal *et al.*, 2014.

Los espermatozoides son unas células altamente vulnerables al EO. Por una parte, y como se ha comentado, carecen de una adecuada protección antioxidante intrínseca, y por otra parte, poseen una gran cantidad de dianas a las que los RL pueden atacar, como los ácidos grasos insaturados de la membrana plasmática y el DNA, tanto mitocondrial como nuclear (Aitken y koppers, 2011; Kovac *et al.*, 2013). Uno de los primeros daños que producen los RL es la peroxidación lipídica de la membrana plasmática, afectando a su fluidez e integridad. Esto supone la

alteración de la estructura de receptores de proteínas, enzimas y proteínas de transporte, lo que conlleva fallos en las funciones dependientes de gradientes iónicos y transducción de señales (Agarwal *et al.*, 2014; Fraczek y Kurpisz, 2005). Posteriormente, en fases más avanzadas del EO, se produce la oxidación del DNA (que finalmente conduce a su fragmentación) y se inician distintas rutas de muerte celular programada o apoptosis (Agarwal *et al.*, 2014; Fraczek y Kurpisz, 2005). Resultado de estos daños, se producen una serie de alteraciones en la fisiología del espermatozoide, que resultan en: 1) el empeoramiento de los parámetros espermáticos (movilidad, concentración y morfología), 2) la desregulación de la reacción acrosómica, 3) la imposibilidad de reconocimiento y fusión entre el espermatozoide y el oocito, 4) el empeoramiento de la calidad y viabilidad embrionaria (Zorn *et al.*, 2003; Meseguer *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2014, Homa *et al.*, 2015) y 5) la disminución de las posibilidades de conseguir una gestación tras el uso de TRA (Deepinder *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo puede ser analizado mediante la determinación de las ROS, de las proteínas o lípidos oxidados, y/o de la concentración de enzimas antioxidantes, como la GPx (sobre todo de las isoformas GPx1 y GPx4) (Garrido *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2013). Así, se ha observado que en los espermatozoides de varones infértiles, el sistema glutatión está alterado y presenta una menor actividad (Garrido *et al.*, 2004). Por otra parte, la expresión de GPx4 en los espermatozoides está positivamente relacionada con la morfología de los embriones en día 3 de desarrollo, mientras que una menor actividad de GPx1 está relacionada con un peor desarrollo y calidad embrionaria de los embriones en día 5 (Meseguer *et al.*, 2006). Sin embargo, no se han encontrado diferencias entre las muestras que consiguen gestación y las que no, probablemente debido a la selección embrionaria antes de la transferencia (Meseguer *et al.*, 2006; Garrido *et al.*, 2008).

En cuanto a la utilidad de los marcadores de estrés oxidativo como pruebas diagnósticas de la fertilidad masculina, la falta de consenso en cuanto a los test diagnósticos, los límites de normalidad y los insuficientes datos clínicos, limitan su uso clínico en los centros de reproducción (Garrido *et al.*, 2008).

### **4.2.2. Marcadores apoptóticos**

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso controlado mediante el que el organismo elimina células envejecidas o defectuosas contribuyendo a la homeostasis de los tejidos. La apoptosis, consiste en la inducción de una serie de

alteraciones morfológicas y bioquímicas, que conllevan la muerte de las células (Kerr *et al.*, 2002). De la misma manera, y en relación a los espermatozoides, la apoptosis asegura la eliminación selectiva de las células germinales inmaduras o que han sido dañadas durante su desarrollo (Aitken y Baker, 2013). Las características bioquímicas de la apoptosis incluyen la externalización de la PS, la activación de la vía de las caspasas, y finalmente la fragmentación del DNA (Fadok *et al.*, 1992). Diversos estudios han relacionado estas características bioquímicas con la infertilidad masculina al observar que los varones infértiles presentan un mayor número de espermatozoides apoptóticos (Specht *et al.*, 2012). Además, se ha evidenciado que en estos varones se produce un aumento en la actividad de las caspasas, y en la externalización de la PS (Barroso *et al.*, 2000; Paasch *et al.*, 2004; Grunewald *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2009; Aitken y Curry, 2011).

### 4.2.3. Ubiquitina

La ubiquitina, es otra molécula que también ha sido relacionada con el correcto desarrollo espermático. Así, los espermatozoides defectuosos son marcados con esta molécula a su paso por el epidídimo, de forma que posteriormente son fagocitados. La presencia de un alto grado de ubiquitinización en espermatozoides eyaculados puede indicar la existencia de fallos en este proceso (Sutovsky *et al.*, 2001; Sutovsky *et al.*, 2004; Muratori *et al.*, 2009). Por otra parte, la presencia de un gran número de espermatozoides defectuosos, puede disminuir el potencial fértil del eyaculado (Sutovsky *et al.*, 2001; Sutovsky *et al.*, 2004; Muratori *et al.*, 2009). Sin embargo, no existe un consenso sobre la relación entre el nivel de ubiquitinación y la calidad espermática, lo que limita el uso de este marcador como valor pronóstico del potencial fértil de una muestra (Muratori *et al.*, 2009).

### 4.2.4. Integridad del DNA

La integridad del DNA espermático puede verse afectada a través de distintos mecanismos o condiciones, que alteran la homeostasis celular desencadenando distintos procesos. Algunos de los mecanismos que producen un daño irreversible en el DNA del gameto masculino son: 1) el empaquetamiento anormal de la cromatina (errores en la sustitución de histonas por protaminas o fallos en las enzimas que reparan roturas del estrés torsional); 2) el estrés oxidativo; y 3) los procesos de apoptosis (Carrell *et al.*, 2007; Agarwal y Said, 2005; Aitken y Baker, 2013). Igualmente, tanto los estadios avanzados de estrés oxidativo como las fases avanzadas del proceso apoptótico resultan en la fragmentación del DNA (Aitken y

koppers, 2011; Aitken y Baker, 2013). Cabe destacar que estos factores no tienen porque actuar de forma excluyente, sino que pueden actuar simultáneamente, contribuyendo en mayor o menor grado a la fragmentación del DNA (Aitken y koppers, 2011).

### **4.2.4.1. Empaquetamiento anómalo de cromatina**

La compactación de la cromatina es un proceso complejo en el que se produce el reemplazo de las histonas por las protaminas. Por lo que cualquier alteración en el reemplazo de las histonas por protaminas, puede producir una mala compactación del DNA, creando zonas vulnerables al EO (Francis *et al.*, 2014). En el varón, existen dos tipos de protaminas: las protaminas 1 y 2 (P1 y P2), las cuales se encuentran en igual proporción en el genoma (Carrell *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2011). Alteraciones en la proporción de protaminas han sido relacionadas con alteraciones en la espermatogénesis que resultan en una mayor tasa de fragmentación del DNA y en globozoospermia, un tipo de teratozoospermia que se caracteriza por la ausencia de compactación del núcleo y de vesícula acrosómica (Carrell *et al.*, 2007; Francis *et al.*, 2014). Asimismo, los varones con alteraciones en el ratio P1/P2 normalmente presentan una peor calidad seminal y menores tasas de fecundación y gestación tras la realización de tratamientos de fecundación *in vitro* (Castillo *et al.*, 2011; Nanassy *et al.*, 2011).

Además de fallos durante la compactación de la cromatina, los fallos en la corrección de roturas en el DNA afectan a la integridad del espermatozoide. Durante la espermatogénesis, se producen una serie de roturas en la cadena de DNA con el fin de reducir el estrés torsional que supone el superenrollamiento de la cromatina durante su compactación (Sakkas *et al.*, 1995; Kierszenbaum, 2001). Consecuentemente, cualquier fallo en las enzimas que reparan estas roturas, puede resultar en la fragmentación del DNA (Aitken y koppers, 2011).

### **4.2.4.2. Estrés oxidativo (EO)**

Se ha sugerido que la mayoría de los daños en el DNA de los espermatozoides humanos son causados por el EO (Aitken y koppers, 2011). Como ya se ha expuesto, el EO puede dañar el DNA espermático debido a un exceso a elementos oxidantes y/o a la deficiencia de sustancias antioxidantes (Ji *et al.*, 2012).

Cuando se oxida el DNA, uno de los derivados que se produce en mayor proporción es la 8-hydroxydeoxyguanosina (8-OHdG) (Kasai *et al.*, 1984). EL 8-OH-dG es un marcador muy sensible, que puede ser cuantificando mediante citometría de flujo (Santisto *et al.*, 2010). De forma que su determinación permite medir de manera indirecta el grado de oxidación en el DNA causado por el estrés oxidativo (Kasai, 1997; Aitken y koppers, 2011). La oxidación del ADN espermático ha sido relacionada con una peor calidad embrionaria y menores tasas de fecundación tras la aplicación de TRA (Aguilar *et al.*, 2010; Meseguer *et al.*, 2008)

### 4.2.4.3. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, como ya se ha explicado, es otro de los mecanismos que conlleva el deterioro del DNA celular, ya que los estadios finales de la apoptosis desencadenan en la fragmentación del DNA (Aitken y Baker, 2013). Como se ha expuesto en el apartado anterior, algunos de los marcadores usados para la valoración de este parámetro son la externalización de la PS o la determinación de las caspasas (Barroso *et al.*, 2000; Grunewald *et al.*, 2009; Sutovsky *et al.*, 2001).

### 4.2.4.4. Fragmentación del ADN

La fragmentación o rotura de la doble hélice de DNA, principalmente puede producirse por anomalías en el empaquetamiento de la cromatina espermática, por el estrés oxidativo o como consecuencia del proceso de muerte celular programada (Aitken y koppers, 2011). Además, hay que resaltar que la población de espermatozoides del eyaculado es muy heterogénea, pudiendo encontrar distintos grados y porcentajes de espermatozoides con el DNA fragmentado. Aunque este porcentaje tiende a ser mayor en los varones infértiles (Evenson *et al.*, 1999; Zini *et al.*, 2001). No obstante, y a pesar de que la fragmentación del DNA espermático disminuye la calidad seminal, no siempre supone una disminución del potencial fértil del varón (Aitken *et al.*, 1998). Sin embargo, la integridad del genoma paterno es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a término, tanto *in vivo* como *in vitro*. Así, la presencia en el embrión de ciertas modificaciones a nivel de nucleótidos y/o fragmentación en las cadenas del DNA procedentes del complemento genómico paterno (que no hayan sido reparadas por el oocito después de la fecundación), puede ser incompatible con un desarrollo embrionario y fetal normal, produciéndose abortos o pérdidas gestacionales (De Jonde, 2002; Muratori *et al.*, 2011; Payan-Carreira *et al.*, 2013; Ruvolo *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta estos datos, se diseñaron distintos test que evalúan la fragmentación del DNA (Tabla 6) (Payan-Carreira *et al.*, 2013).

Principales marcadores de fragmentación del ADN espermático
1. Medida de la diferente susceptibilidad del ADN a ser desnaturalizado
Commet assay
Test de la estructura de la cromatina espermática (SCSA)
Test de la dispersión de la cromatina espermática (SCD) (Halosperm®)
Detección de roturas del ADN mediante hibridación fluorescente <i>in situ</i> (DBD-FISH)
2. Test que marcan los puntos de rotura del ADN
Test TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP)
In Situ Nick Translation (ISNT)
3. Métodos para observar la estructura de la cromatina
Tinciones de naranja de acridina, azul de anilina, cromomicina $\alpha$ y azul de toluidina

**Tabla 6.** Principales test usados para la valoración de la fragmentación del ADN espermático.

A pesar de su potencial utilidad en el estudio de la infertilidad masculina de origen desconocido, diversos estudios han observado que la fragmentación de DNA no guarda una relación demasiado relevante a nivel clínico con la tasa de fecundación en ciclos en los que se ha realizado ICSI (Muriel *et al.*, 2006a), ni tampoco con la tasa de embarazo en ciclos de inseminación intrauterina (IUI) (Muriel *et al.*, 2006b). De forma que el estudio de la fragmentación del DNA podría ser un análisis adicional el estudio del varón infértil, pero no podría ser considerado como un estudio indispensable debido a su escaso valor pronóstico (Garrido *et al.*, 2008). De igual forma, su valor como prueba diagnóstica genera mucha controversia. Mientras que distintos autores no han encontrado ninguna relación entre el grado de fragmentación y la capacidad de conseguir una gestación (Muriel *et al.*, 2006b; Anifandis *et al.*, 2015), otros han demostrado que un índice de fragmentación superior al 30-40% es incompatible con la fertilidad *in vivo* (Evenson *et al.*, 2002). Además, aunque tras la realización de tratamientos de fecundación *in vitro*, también se ha visto una relación negativa con las tasas de implantación y gestación (Lopes *et al.*, 1998; Frydman *et al.*, 2008), o la de RNV (Simon *et al.*, 2014), el valor

de corte que establece cada autor es muy variable (Garrido *et al.*, 2008). No obstante, aislar la influencia real de la fragmentación del DNA espermático sobre la fecundación y el desarrollo embrionario es altamente complicado. Esta dificultad se debe a que, aunque se conoce que parte de este daño es reparado por la maquinaria del oocito, se desconoce con exactitud el grado o la magnitud de la reparación (Menézo *et al.*, 2010; Esbert *et al.*, 2011).

### **4.2.5. Otros Marcadores moleculares de la función espermática**

Además de los marcadores anteriormente citados, y con la información obtenida de la investigación básica y clínica, se han descrito un gran número de moléculas implicadas en la funcionalidad del espermatozoide, algunas de las cuales han sido propuestas como marcadores de infertilidad. Aunque, muy pocos estudios han sido capaces de relacionar a estas moléculas con la infertilidad masculina de forma directa (Garrido *et al.*, 2008; Garrido, 2014).

Estos marcadores moleculares descritos, constituyen un grupo muy heterogéneo de moléculas, como lípidos, canales iónicos, enzimas, receptores de membrana, etc., los cuales además, pertenecen a diferentes sistemas moleculares. Asimismo, estas moléculas están implicadas en distintas funciones de la fisiología espermática, como son: 1) los procesos implicados en la migración a través del tracto reproductor femenino (como la movilidad y la capacitación espermática); 2) las reorganizaciones que sufre la membrana espermática durante su tránsito por el aparato reproductor femenino, y 3) la interacción del espermatozoide con el oocito, la fecundación y la activación oocitaria. Debido a la multitud de marcadores descritos, únicamente se van a enumerar algunos ejemplos de estas moléculas consideradas como esenciales en la función espermática (Tabla 7).

### Otros marcadores de calidad seminal

1. Migración a través del tracto reproductor femenino	
Semenogelina	Robert y Gagnon, 1996; de Lamirande, 2007
Oxido nítrico sintasa (NOS)	Lewis <i>et al.</i> , 1996; Ramya <i>et al.</i> , 2011; Salvolini <i>et al.</i> , 2012
Familia ADAM	Wolfsberg <i>et al.</i> , 1995; Hooft van Huijsduijnen, 1998; Edwards <i>et al.</i> , 2008
Catsper	Quill <i>et al.</i> , 2001; Bhilawadikar <i>et al.</i> , 2013
Tectinas	Hinchcliffe y Linck, 1998; Roy <i>et al.</i> , 2007; Bhilawadikar <i>et al.</i> , 2013
Taquicininas	Ravina <i>et al.</i> , 2007; Pinto <i>et al.</i> , 2010
2. Integridad de la membrana	
Ácidos grasos insaturados	Khosrowbeygi y Zarghami, 2007; Roqueta-Rivera <i>et al.</i> , 2011
Colesterol	Meseguer <i>et al.</i> , 2004; Sheriff y Ali, 2010
Fosfolipasa PLA2G2A	García-Herrero <i>et al.</i> , 2011
3. Interacción del espermatozoide con el oocito	
Acrosina	Francavilla <i>et al.</i> , 1992; Francavilla <i>et al.</i> , 1994; Shimizu <i>et al.</i> , 1997
IZUMO	Inoue, 2005; Inoue <i>et al.</i> , 2007; Hayasaka, <i>et al.</i> , 2007
Hialuronidasa	Swyer, 1947; Hirayama <i>et al.</i> , 1989; Modelski <i>et al.</i> , 2014
Factor activador plaquetario (PAF)	Toledo <i>et al.</i> , 2003; Muratori <i>et al.</i> , 2009
Fosfolipasa C (PLC)	Coonrod <i>et al.</i> , 1999; Amdani <i>et al.</i> , 2013; Kashir <i>et al.</i> , 2015

**Tabla 7.** Otros marcadores de calidad seminal. Ejemplos de algunas moléculas implicadas en distintas funciones espermáticas.

### 4.3. Aplicación de las ciencias “-ómicas” en el estudio de la funcionalidad espermática

El término “-ómica” define un sistema biológico, entendiendo por sistema un todo o parte funcional de un organismo. Las ciencias “-ómicas” engloban a todas aquellas disciplinas, tecnologías y áreas de investigación que estudian la totalidad de un sistema biológico (Garrido *et al.*, 2013). Se desarrollaron basándose en los resultados conseguidos por el proyecto genoma humano y han supuesto una revolución al permitir el estudio masivo de cientos de miles de genes, proteínas o

metabolitos en un mismo experimento. Lo que está permitiendo obtener una visión global de los procesos biológicos (Egea *et al.*, 2014).

Desde hace unos años, estas tecnologías también están siendo aplicadas en el estudio de la fisiología y fisiopatología espermáticas, en un intento de describir los rasgos moleculares de los espermatozoides con más éxito fecundante (Garrido *et al.*, 2013; Egea *et al.*, 2014). Para ello, las aproximaciones más usadas han sido la transcriptómica y proteómica, mientras que la genómica, epigenómica (Castillo *et al.*, 2014), metabolómica (Deepinder *et al.*, 2007) y lipidómica (Wenk, 2010) han empezado a utilizarse más recientemente.

### 4.3.1. Transcriptómica

La transcriptómica es la ciencia que estudia el conjunto de RNAm que expresa una célula bajo unas condiciones determinadas y en un momento concreto. Los estudios de los perfiles de RNAm emplean distintas técnicas como RNAseq, o microarrays de RNAm (Egea *et al.*, 2014).

A pesar de que los espermatozoides son células traduccional y transcripcionalmente inactivas, durante estos últimos años se ha demostrado que portan más de 3000 tipos de RNA distintos (Lalancette *et al.*, 2009; Bansal *et al.*, 2015). Sin embargo, aunque la presencia de RNA en el espermatozoide está comúnmente aceptada, su importancia funcional genera mucha controversia. Por una parte, muchos autores asumen que estos RNA son productos residuales que permanecen en el citoplasma tras el proceso de espermatogénesis (Miller *et al.*, 2005). Pero, por otra parte, se ha observado que existe una degradación selectiva de RNA seminales en el citoplasma del oocito, lo que indica la existencia de una población de RNAs estables (Ostermeier *et al.*, 2005; Lalancette *et al.*, 2008). Además, se ha sugerido que estos RNAs podrían: 1) ayudar en la compactación de la cromatina, 2) participar en la impronta de algunos genes, 3) ser traducidos a proteínas por los polisomas mitocondriales, 4) activar al cigoto durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario y 5) conferir el patrón espacial al embrión temprano (Lalancette *et al.*, 2008; Miller y Ostermeier, 2006a; Miller y Ostermeier, 2006b).

Mediante el uso de esta tecnología se ha demostrado que existen diferencias entre los perfiles de expresión génica o transcriptómicos, de donantes fértiles y pacientes infértiles (García-Herrero *et al.*, 2010a), así como entre los pacientes que consiguen

o no una gestación tras el uso de distintas TRA (Garcia-Herrero *et al.*, 2010b; Garcia-Herrero *et al.*, 2011). Siendo mayor este requerimiento molecular cuanto menos invasiva es la técnica empleada (Garrido *et al.*, 2013).

La transcriptómica podría suponer una herramienta diagnóstica en la evaluación de la infertilidad masculina mediante el análisis de expresión de RNAm espermático, ayudando además, a la elección del tratamiento reproductivo más adecuada (Samplaski *et al.*, 2010; Garrido *et al.*, 2013).

### 4.3.2. Proteómica

La proteómica es la ciencia que estudia el conjunto de proteínas presentes en un organismo o sistema biológico. Este tipo de estudios emplean técnicas de separación de proteínas en condiciones desnaturalizantes en una o dos dimensiones (1D-SDS-PAGE o 2D-SDS-PAGE), electroforesis diferenciales de dos dimensiones (2D-DIGE), así como otras técnicas como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectrometría de masas (MS), cromatografía de fase líquida reversa acoplada a tándem MS (RS-LC-MS/MS), arrays de proteínas, y técnicas de deionización asistida por laser acoplada a MS (MALDI-TOFF) (Egea *et al.*, 2014).

Los espermatozoides son unas células particularmente adecuadas en este tipo de análisis, ya que son células muy accesibles, fáciles de purificar (Oliva *et al.*, 2008; Codina *et al.*, 2015) y son traduccionalmente inactivas (Bansal *et al.*, 2015). El uso de esta metodología en el campo de la infertilidad masculina está siendo de gran ayuda tanto en la búsqueda de biomarcadores, como en la generación de perfiles proteicos que puedan ayudar a mejorar el diagnóstico y a desarrollar estrategias para seleccionar los mejores espermatozoides para usar en las TRA (Egea *et al.*, 2014).

Mediante este último tipo de análisis, se ha podido establecer que los varones fértiles presentan un perfil proteico distinto de los infértiles (Martinez-Heredia *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2012). Es por ello que el empleo de distintas aproximaciones metodológicas para el estudio de las proteínas espermáticas, combinado con las proteínas presentes en el líquido seminal (Gilany *et al.*, 2015; Intasqui *et al.*, 2015), podría ayudar a elucidar el papel de las distintas proteínas en la regulación de la movilidad, capacitación, reacción acrosómica y fecundación, al igual que a establecer biomarcadores para la infertilidad masculina (Oliva *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2012).

La proteómica, por tanto, representa una herramienta extraordinaria para la evaluación de los mecanismos moleculares que regulan la función de los espermatozoides. Ayudando a dilucidar las bases moleculares de las funciones espermáticas que están alteradas en los varones infértiles, y que pueden ser usadas tanto para diagnosticar, como tratar esta condición. Mediante estas aproximaciones se pueden obtener valiosos catálogos de proteínas que representen un estado fisiopatológico particular. Posteriormente, estas proteínas identificadas han de ser estudiadas para determinar si tienen algún valor clínico para la evaluación de infertilidad masculina (Rhaman *et al.*, 2013).

Considerando todos estos datos, se puede determinar que aunque se han descrito varios factores espermáticos que parecen estar relacionados con la fertilidad masculina, ninguno de ellos parece ser lo suficientemente importante como para impedir la fecundación, lo que lleva a la hipótesis de que la infertilidad masculina está causada por la combinación de diferentes factores o moléculas. Además, hay que tener en cuenta que estas moléculas no actúan de forma independiente sino que forman parte de complejos sistemas moleculares, que frecuentemente interactúan con otros sistemas. De forma que alteraciones cuantitativas o cualitativas de cualquiera de estos elementos podrían ocasionar alteraciones en las cascadas o rutas moleculares en las que participan. Esto podría suponer la desregulación de distintos procesos fisiológicos, algunos de los cuales podrían ocasionar infertilidad, disminuir el potencial fértil del varón o incluso afectar a los procesos de fecundación y desarrollo embrionario.

## 5. Sistema Renina-Angiotensina

### 5.1. Descripción del Sistema Renina-Angiotensina (RAS)

El sistema renina-angiotensina (RAS) 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 *et al.*, 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 *et al.*, 2013). Todo esto supone que el RAS no sólo actúa a nivel sistémico sino también, a nivel local e intracelular, mediante mecanismos paracrinos y autocrinos (Atlas, 2007; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

#### 5.1.1. RAS clásico o sistémico

En su concepto clásico o sistémico, el RAS es un sistema hormonal circulante, que regula la presión arterial (PA) y el equilibrio hidrosalino, a través de la angiotensina II (Ang II) y la aldosterona, respectivamente. Esta vía comienza cuando la renina es liberada por el riñón a la circulación sanguínea, en respuesta a la disminución de la PA, la activación del sistema nervioso simpático y/o la depleción de sodio (Crowley y Coffman, 2012). Esta renina actúa sobre el angiotensinógeno (AGT), de procedencia hepática, formando angiotensina I (Ang I). Este decapeptido, es hidrolizado por la enzima convertidora de angiotensina (ACE), dando lugar al principal péptido activo de este sistema, la angiotensina II (Ang II), que finalmente ejerce su acción interactuando con los receptores de Ang II tipo 1 y 2 (AT1R y AT2R) (De Gasparo *et al.*, 1999; Paul *et al.*, 2006; Herr *et al.*, 2013). De esta forma, la Ang II produce una serie de respuestas tales como la vasoconstricción de la circulación periférica, el aumento de la actividad del sistema simpático, la liberación de vasopresina, el aumento del cronotropismo cardíaco y la liberación de aldosterona por la corteza suprarrenal, que permiten restaurar la volemia y la PA. A su vez, la propia Ang II, inhibe la síntesis y liberación de renina, regulando la activación del RAS (Paul *et al.*, 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

### 5.1.2. RAS local o tisular

El concepto de RAS local o tisular surgió tras observar la existencia de distintos componentes del RAS en diversos tejidos que no mantenían ninguna relación con las funciones del RAS sistémico, y sobre los cuales además, ejercían funciones específicas (Atlas, 2007; Herr *et al.*, 2013). Estos RAS locales se caracterizan por: 1) la presencia de distintos componentes, como AGT y las enzimas de conversión; 2) la síntesis local de Ang II y otras angiotensinas; y 3) la unión a sus receptores específicos, que como resultado desencadena una respuesta fisiológica local (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Otra de las características de estos RAS locales, es que pueden actuar como entidades aisladas, o interactuando con el RAS sistémico y/o con otros sistemas moleculares (Paul *et al.*, 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

En cuanto a su distribución, se han observado RAS locales en un amplio abanico de órganos y tejidos tales como: riñón, cerebro, páncreas, sistema cardiovascular, pituitaria, tejido adiposo, piel, glándula suprarrenal, y aparato reproductor femenino y masculino (Gupta *et al.*, 1995; Mulrow, 1998; Vinson y Ho, 1998; Bader *et al.*, 2001; Varagic y Frohlich, 2002; MacKenzie *et al.*, 2002; McKinley *et al.*, 2003; Leung y Carlsson, 2005; Atlas, 2007).

### 5.1.3. RAS intracelular

El RAS intracelular se caracteriza por la presencia de los distintos componentes de RAS en el interior de las células, así como por la síntesis de Ang II en una localización intracelular. Este concepto surgió al observar la existencia de diferentes formas de AGT y renina (resultado de glicosilaciones o splicing alternativo, respectivamente), diferentes formas de ACE (intracelular y secretada), la existencia de enzimas alternativas para la síntesis de Ang II (como catepsinas y quimasas), y finalmente por la detección intracelular de estos componentes bajo unas condiciones celulares determinadas (Kumar *et al.*, 2007).

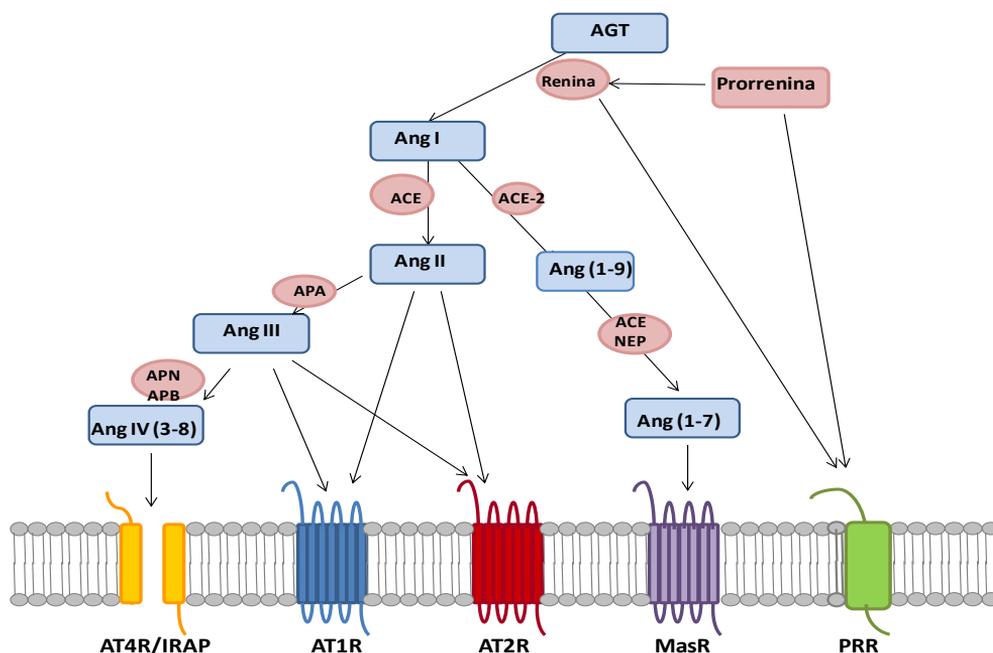
Al igual que en los otros RAS, la Ang II es el principal péptido bioactivo del RAS intracelular. El hecho de que se hayan comprobado efectos de la Ang II intracelular en una amplia variedad de tipos celulares (células cardíacas, renales, hepáticas o vasculares) indica que se trata de un sistema muy relevante (Kumar *et al.*, 2007). Este mecanismo de acción intracelular de la Ang II involucra a las reservas de calcio intracelulares, a distintas rutas de señalización intracelular (como la de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la de quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas o

MAPK), así como a los receptores intracelulares de la Ang II. Sin embargo, aunque la Ang II es el principal péptido bioactivo del RAS intracelular, también la renina o la prorrenina, pueden tener efectos intracelulares, ya que existe un receptor intracelular para éstos, el receptor de prorrenina-renina (PRR), que se acopla a un sistema de transducción de señales en cascada a través de vía de las proteínas quinasas reguladas por señales intracelulares 1 y 2 (ERK1/ERK2) (Re, 2003).

## 5.2. Ejes o vías que componen el RAS

En su concepto clásico, el RAS es un sistema hormonal circulante, formado por el conocido como eje o vía clásica. Posteriormente han ido incorporándose nuevos componentes, proporcionando una visión mucho más compleja de este sistema, apareciendo así tres nuevos ejes, denominados vías alternativas o no clásicas del RAS (Paul *et al.*, 2006) (Figura 8).

- **Eje Renina/ACE/Ang II/AT1R/AT2R.** Este eje o vía clásica, está formado por el AGT, la renina, la enzima ACE, la Ang I y Ang II, y sus receptores, AT1R y AT2R. Además, a partir de la Ang II por la acción de la enzima Aminopeptidasa A (APA), se produce angiotensina III (Angiotensina 2–8 o Ang III), que también ejerce su acción, a través de AT1R y AT2R (De Gasparo *et al.*, 1999; Paul *et al.*, 2006; Herr *et al.*, 2013). Este eje, aunque en un principio fue descrito como la vía efectora del RAS a nivel sistémico, también se ha visto que actúa tanto a nivel local como intracelular (Paul *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007).
- **Eje ACE2/Ang (1–7)/Receptor Mas.** La Ang I, además de transformarse en Ang II, también tiene potencialidad para transformarse en Ang (1–9) a través de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). La Ang (1–9) es a su vez transformada por las enzimas neprilisina (NEP) o ACE en Angiotensina (1–7) para, finalmente, ejercer su acción a través de la unión al receptor Mas (MasR) (Santos *et al.*, 2003).
- **Eje Ang IV/AT4R-IRAP.** En éste eje, la Ang III es transformada a angiotensina (3–8), también denominada angiotensina IV (Ang IV), por la acción de la aminopeptidasa N (APN) y la aminopeptidasa B (APB). Ejerciendo su acción, finalmente, a través de la unión al AT4R o IRAP (aminopeptidasa regulada por insulina) (Albiston *et al.*, 2001).



**Figura 8.** Visión actual del sistema renina angiotensina. **Péptidos:** AGT: Angiotensinógeno; Ang I: angiotensina I, Ang II: angiotensina II; Ang III: angiotensina III; Ang VI: angiotensina (3-8) o VI; Ang (1-9): angiotensina (1-9); Ang (1-7): angiotensina (1-7). **Receptores:** AT1R: receptor de Ang II tipo 1; AT2R: receptor de Ang II tipo 2; AT4R/IRAP: receptor de Ang IV; MasR: receptor de Ang (1-7) o receptor Mas; PRR: receptor de prorenina-renina. **Enzimas:** ACE: enzima convertidora de angiotensina; ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2; APN: aminopeptidasa N; NEP: endopeptidasa neutra; APA: Aminopeptidasa A; APB: Aminopeptidasa B.

- **Eje prorenina-renina/PRR.** La observación de la existencia de los receptores de renina (Nguyen *et al.*, 2002), sugirió que tanto la prorenina, proteína precursora de la renina, como la propia renina, actúan sobre el PRR de forma independiente al eje clásico (Zhuo *et al.*, 2013).

### 5.3. Componentes de RAS

Como se ha descrito, el RAS es un sistema complejo, que está compuesto por AGT, numerosos péptidos de Ang, receptores específicos de estas Ang, y distintas enzimas. A continuación se detallan los componentes del RAS considerados como

más relevantes en el sistema reproductor masculino, y las funciones más destacables de dichos componentes a nivel global (Figuras 8 y 9).

### 5.3.1. Angiotensinógeno y angiotensinas

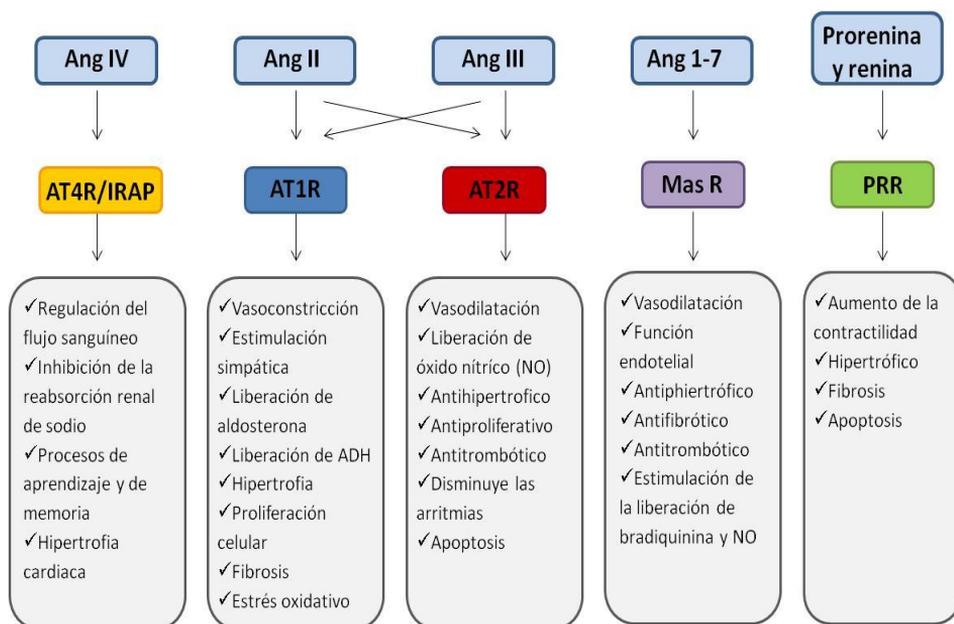
***El angiotensinógeno (AGT)*** es una glicoproteína perteneciente a la familia de la  $\alpha_2$ -globulinas. Es el péptido iniciador de este sistema y es el único sustrato conocido de la renina. La mayoría del AGT circulante se produce y secreta por el hígado. Tras su expresión hepática, este se libera constitutivamente viajando por la circulación sanguínea, actuando tanto en el RAS sistémico como en los distintos RAS locales. Sin embargo, también puede ser sintetizado en otros órganos y tejidos, como el riñón o el tejido adiposo blanco, actuando de forma local (Kobori *et al.*, 2007).

La ***angiotensina I (Ang I)*** o angiotensina (1-10), es un decapeptido inestable, por lo que es rápidamente hidrolizado por la ACE formándose la Ang II (Fournier *et al.*, 2012). Sin embargo, cuando la ACE está inhibida, la Ang I puede ejercer acciones similares a la producidas por la Ang II, aunque con una menor eficacia (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Se ha observado que la Ang I es capaz de estimular la liberación de catecolaminas de la médula adrenal e inducir sed (efecto dipsogénico), cuando se inyecta directamente en el sistema nervioso central (Hertting y Meyer, 1974).

La ***angiotensina II (Ang II)*** o angiotensina (1-8), es el principal péptido bioactivo del RAS. Es un octapeptido con una vida media de aproximadamente un minuto (Kobori *et al.*, 2007). Ejerce su acción a través de sus receptores AT1R y AT2R, los cuales, por lo general, desempeñan funciones opuestas (De Gasparo *et al.*, 2000; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). La Ang II es el principal regulador de la homeostasis de sodio y fluidos, pero también participa en el crecimiento celular y la remodelación vascular (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La ***angiotensina III (Ang III)*** o Ang (2-8), es un heptapeptido que ejerce su acción, en principio similar a la de la Ang II, vía AT1R y AT2R. Aunque la Ang II se considera el principal efector del RAS, la Ang III puede resultar igual o incluso a veces más relevante en algunas de las acciones mediadas por el AT1R, tal como la liberación de vasopresina. Se ha observado que la Ang III está implicada en la secreción de aldosterona, la excreción de sodio y la regulación de la PA (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Sin embargo, la vida media de este péptido es tan corta que sus efectos globales son débiles (De Gasparo *et al.*, 2000; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La **angiotensina IV (Ang IV)** o angiotensina (3-8) es un hexapéptido que actúa mediante la activación del AT4R/IRAP (Albiston *et al.*, 2001). Varios estudios sugieren que la Ang IV desempeña un papel muy importante en la regulación de las funciones cognitivas, del metabolismo renal y del daño cardiovascular, así como en la regulación del crecimiento de distintos tipos celulares (fibroblastos cardiacos, células endoteliales y células del músculo liso). Además, está implicada en la respuesta inflamatoria vascular, y posiblemente en la fisiopatología cardiovascular (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).



**Figura 9.** Efectos que producen los distintos péptidos de angiotensinas, la renina y su péptido precursor, la prorenina, a través de sus correspondientes receptores. Imagen modificada de Fyhrquist y Saijonmaa, 2008.

La **angiotensina (1-7) (Ang 1-7)** es un heptapéptido que ejerce sus acciones a través de su unión al receptor Mas. Aunque se forma por acción de la ACE2 sobre la Ang II, también puede ser producida a partir de la Ang I o la Ang II por la acción de otras enzimas (Santos *et al.*, 2003). Durante mucho tiempo se pensó que esta angiotensina carecía de efectos biológicos, pero posteriormente se vio que tiene efectos tanto vasodilatadores como antiproliferativos, y que también desempeña acciones opuestas a la Ang II (Paul *et al.*, 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

### 5.3.2. Receptores

El **receptor de Ang II tipo 1 (AT1R)** pertenece a la familia de receptores unidos a proteínas G, con siete dominios transmembrana, y es considerado como el principal efector de la Ang II. Aunque se une preferentemente a la Ang II, también puede unirse a la Ang III (De Gasparo *et al.*, 2000). Muestra una amplia distribución en el organismo, siendo muy abundante en los tejidos periféricos y el cerebro (Paul *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2010). El AT1R principalmente ejerce funciones potencialmente perjudiciales, estando implicado en la proliferación celular o el estrés oxidativo (Paul *et al.*, 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

El **receptor de Ang II tipo 2 (AT2R)** también pertenece a la familia de receptores unidos a proteínas G, aunque durante mucho tiempo no fue considerado como tal al no cumplir todas las características típicas de estos receptores (Porrello *et al.*, 2009). Se activa principalmente por la Ang II, aunque también puede unirse a otras Ang, como la Ang III (De Gasparo *et al.*, 2000). Se expresa de forma abundante en los tejidos fetales y uteroplacentarios, así como en el corazón, cerebro, endotelio vascular y tejidos adrenales y pancreáticos de adultos (Paul *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2010). Este receptor comparte con el AT1R, una homología del 30%, y tradicionalmente se ha establecido que desempeña funciones opuestas a las del AT1R, ejerciendo distintas acciones protectoras como son la vasodilatación, la liberación de NO, la inhibición de la proliferación celular, y la natriuresis (De Gasparo *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Posteriores estudios demostraron que en algunos casos el AT2R puede ejercer acciones similares a las del AT1R, como las que lleva a cabo en los procesos de inflamación (Levy, 2004).

El **receptor de Ang IV (AT4R)** ha sido identificado como la aminopeptidasa de membrana regulada por insulina (IRAP) (Albiston *et al.*, 2001), siendo su principal ligando la Ang IV. La IRAP (EC 3.4.11.3), es una metalopeptidasa de Zn que puede localizarse en la membrana plasmática celular o de forma soluble, conociéndose esta última como leucina aminopeptidasa placentaria (P-LAP) u oxitocinasa (Chai *et al.*, 2004). El AT4R ha sido identificado en distintos tejidos como nervioso y renal, y el reproductor femenino y masculino, sobre los que ejerce funciones como la adquisición de la memoria, la angiogénesis, la invasión uterina por parte de las células de trofoblasto embrionario, el aumento de la actividad nerviosa simpática

en la próstata y la contractibilidad de la próstata y del epidídimo (De Gasparo *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2010).

El **receptor de Ang (1-7) o receptor Mas (MasR)** pertenece a la familia de los receptores unidos a proteínas G, que recientemente ha sido identificado como el protooncogen Mas, un conocido factor tumorigénico, razón por lo que se le pasó a denominar MasR (Santos *et al.*, 2003). Está ampliamente distribuido en el organismo, encontrándose en cerebro, testículos, corazón, riñón, pulmón, hígado y músculo esquelético (Iwai y Horiuchi, 2009). Entre sus funciones, destacan el mantenimiento de la homeostasis durante el embarazo, la vasodilatación y la inhibición de la proliferación celular, antagonizando así los efectos del AT1R (Iwai y Horiuchi, 2009; Paul *et al.*, 2006).

El **receptor de prorenina-renina (PRR)**, también denominado ATP6AP2, es una proteína transmembrana que actúa asociada a una proteína sintasa vacuolar pudiendo funcionar como subunidad H<sup>+</sup>-ATPasa (V-ATPasa) (Nguyen *et al.*, 2002; Zhuo *et al.*, 2013). Aunque hay una única proteína ATP6AP2, se puede encontrar en tres diferentes formas moleculares como consecuencia de modificaciones intracelulares: 1) como una proteína integral de membrana; 2) en forma soluble, en plasma y orina; y 3) como una forma truncada compuesta por los dominios transmembrana y citoplasmático (Nguyen y Muller, 2010; Nguyen, 2011). El PRR se expresa en gran variedad de tejidos, entre los cuales destacan el cerebro, el corazón y la placenta (Paul *et al.*, 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). El receptor de prorenina-renina ejerce una doble función, por un lado el PRR puede ser activado directamente por prorenina o renina, como ya se ha comentado, desencadenando una señal intracelular al activar la vía de las ERK1/ERK2, y por otro lado, cuando este receptor está unido a renina, puede actuar como cofactor en la lisis del AGT, aumentando la eficiencia con la que se produce este proceso, y facilitando así la formación de Ang I (Nguyen *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2006). Además recientemente se ha descrito una nueva función del PRR, participando en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa constituyendo el complejo del receptor Wnt y regulando varios procesos de homeostasis celular, incluida la autofagia (Balakumar y Jagadeesh, 2011; Binger y Muller, 2013).

### 5.3.3. Principales enzimas

**La renina** (EC 3.4.23.15), es una aspartil-proteasa principalmente de origen renal, con una elevada especificidad por el AGT, su único sustrato conocido *in vivo*. Además, se ha visto que puede ser sintetizada a nivel local por distintos órganos y tejidos, e incluso a nivel celular (Re, 2003). Se forma a partir de la prorrenina, y es el factor limitante en la cascada de reacciones que dan lugar a la síntesis de Ang II (Oliver y Gross, 1966). Aunque estrictamente no es una hormona, muchas veces se la considera como tal debido a su papel en la formación de la Ang I, y al estricto mecanismo de regulación al que está sujeta (Kobori *et al.*, 2007).

**Las enzimas convertidoras de angiotensina, ACE** (EC 3.4.15.1), y **ACE2**, pertenecen al grupo de las metaloproteasas de Zn. Estas dos enzimas comparten una 42% de homología (Paul *et al.*, 2006). La ACE, enzima idéntica al antígeno de diferenciación CD143, se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, existiendo dos diferentes formas del enzima, la somática o endotelial (sACE) y la testicular (tACE) (Cushman y Cheung, 1971). La forma sACE contribuye principalmente a la homeostasis cardiovascular, mientras que la forma tACE está claramente implicada en la fertilidad masculina (Kurdi *et al.*, 2005). Por su parte la ACE2 es particularmente abundante en el epitelio pulmonar, el intestino delgado, el endotelio vascular renal, el corazón, el hipotálamo, la pared de la aorta y los testículos (Paul *et al.*, 2006; Iwai y Horiuchi, 2009). Se ha demostrado que la ACE2 tiene efectos directos sobre la función cardíaca, ejerciendo diversas acciones protectoras en el sistema cardiovascular (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La **aminopeptidasa A (APA)** (EC 3.4.11.7), también llamada glutámico aminopeptidasa (Glu-AP) o angiotensinasa A, es una aminopeptidasa dependiente de Zn, idéntica al clúster de diferenciación CD249, que puede localizarse en la membrana plasmática celular o de forma soluble en distintos fluidos corporales como plasma o líquido seminal (Suganuma *et al.*, 2004; Agrawal y Vanha-Perttula., 1985). Se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, encontrándose niveles especialmente altos en el riñón (Cheung y Cushman, 1971). Su principal función es transformar la Ang II en Ang III, por lo que ayuda a regular la presión arterial al eliminar la acción vasoconstrictora de la Ang II (Ramirez *et al.*, 2008).

La **neprilisina (NEP)** (EC 3.4.24.11) también conocida como endopeptidasa neutra 24:11, es una metalopeptidasa de Zn idéntica al clúster de diferenciación CD10 que se localiza en las membranas celulares (Letarte *et al.*, 1988). Es una enzima muy

ubicua capaz de degradar múltiples sustratos como las angiotensinas, encefalinas, taquicininas, bradiquininas, etc., interviniendo en distintos procesos como la regulación de la presión arterial, la analgesia, y la contracción del músculo liso en el tracto respiratorio y en el útero (Gafford *et al.*, 1983; Roques, 1991; Matsas *et al.*, 1984; Nadel y Borson, 1988).

La ***aminopeptidasa N (APN)*** (EC 3.4.11.2), es una metalopeptidasa de Zn, idéntica al antígeno de diferenciación CD13 (Look *et al.*, 1989), que puede localizarse en la membrana plasmática celular o de forma soluble en distintos fluidos corporales como plasma, orina o líquido seminal (Antczak *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 1984; Fernández *et al.*, 2002). Está ampliamente distribuida en el organismo, interviniendo en funciones tan dispares como la regulación enzimática de distintos péptidos bioactivos (quininas, encefalinas o citoquinas, entre otras), la diferenciación celular, la angiogénesis, los procesos quimiotácticos y fagocíticos, o sirviendo como receptor viral (Mina-Osorio, 2008).

### 5.4. Principales funciones del SRA

La actual visión del SRA proviene del sistema clásico, que puede definirse como el eje Renina/ACE/Ang II/AT1R/AT2R. Las principales acciones fisiológicas de esta vía clásica son: 1) la regulación tanto de la presión sanguínea, como de las funciones renales y cardiovasculares; 2) la biosíntesis de aldosterona; y 3) la homeostasis de electrolitos y fluidos corporales (Zhuo *et al.*, 2013).

Además, como anteriormente se ha comentado, los RAS locales ejercen diversas acciones de manera local en distintos órganos y tejidos (Tabla 8). Las acciones de los RAS locales están implicadas en numerosos eventos fisiológicos capaces de regular multitud de funciones tales como la función renal, neuronal, cardíaca, pancreática, vascular, adrenal, cognitiva, inflamatoria y reproductiva, entre otras (Chappell, 2012). Recientemente, también se ha descrito que el RAS local podría estar implicado en otras funciones regulatorias como el crecimiento celular, la formación de la matriz extracelular, la proliferación vascular, la función endotelial y la apoptosis (Crowley y Coffman, 2012). Aunque en algunos órganos, como la glándula adrenal o el cerebro, este sistema puede actuar de manera independiente al RAS sistémico, en otros órganos como el corazón y el riñón, el sistema local y el circulante mantienen una estrecha relación, evidenciando que el RAS sistémico y el

local, pueden actuar de forma complementaria. Esta actuación conjunta hace que en mantenimiento de la normal fisiología de muchos órganos dependa de un correcto balance entre los factores reguladores y desreguladores de estos RAS (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Principales funciones atribuidas a los SRA locales		
Aparato o sistema	Órgano o tejido	Función
Aparato excretor	Riñón	Flujo sanguíneo renal Hemodinámica glomerular Reabsorción de sodio (antinatriurético)
	Glándula adrenal	Secreción de aldosterona y catecolaminas
Sistema digestivo	Intestino	Absorción de iones y agua
	Páncreas	Secreción hormonal pancreática
	Tejido adiposo	Desarrollo de hipertensión y desordenes relacionados con obesidad
Sistema cardiovascular	Corazón	Contractilidad, conducción e hipertrofia cardíacas
	Pared vascular	Mantenimiento del tono y estructura vasculares Contractilidad arterial Regulación de la presión arterial
Sistema nervioso central	Cerebro	Neurotransmisión y liberación hormonal Sed, comportamiento
Sistema reproductor	Placenta	Regula el tono vascular útero –placentario y en consecuencia el intercambio de fluido entre madre y feto
	Ovario	Ovulación Producción de estrógenos
	Útero	Contractilidad Flujo sanguíneo
	Testículo	Síntesis de andrógenos
	Epidídimo	Composición del fluido epididimal Contracción de los conductos del epidídimo

**Tabla 8.** Tabla en la que se recogen las principales acciones atribuidas a algunos de los RAS locales presentes en el organismo humano (Paul *et al.*, 2006; MacKenzie *et al.*, 2002).

Asimismo, los RAS locales podrían estar implicados en distintos procesos fisiopatológicos, tales como la hipertensión, la diabetes, y la obesidad, tal y como han evidenciado diversos estudios en animales y ensayos clínicos (Bader *et al.*, 2001; Iwai y Horiuchi, 2009; Skov *et al.*, 2014). Además, se ha visto que está

frecuentemente desregulado en procesos tumorales malignos, correlacionándose con peores pronósticos clínicos (Blanco *et al.*, 2008; George *et al.*, 2010).

En cuanto al RAS intracelular, todavía no se ha esclarecido su papel en la fisiología y fisiopatología, al igual que por el momento se desconoce si se trata de un sistema extendido en todos los tipos celulares o restringido a determinadas células, sistemas o tejidos específicos, o si responde, o no, a ciertas condiciones fisiopatológicas. Algunas de las funciones que se le han atribuido son la inducción de cambios en la estructura celular al ser inyectado en células de músculo liso y cardíaco, cambios en la transcripción génica mediante la unión de la Ang II en puntos específicos de la cromatina, la inducción de la movilización de los depósitos de calcio intracelulares y la estimulación de la proliferación de distintos tipos celulares (Kumar *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha sugerido que el RAS intracelular podría ser englobado dentro del RAS local, siendo el principal mediador de los efectos crónicos de la Ang II en los tejidos (Kurdi *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2007).

## 6. El RAS en la fertilidad masculina

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

### 6.1. El RAS y su implicación en la función testicular

La principal función de los testículos consiste en la formación de espermatozoides o espermatogénesis, estando este proceso modulado por distintos mecanismos endocrinos, paracrinos y/o autocrinos. El primer punto de control de la función reproductora masculina se produce a través del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, mediante el control de la liberación de hormonas sexuales. La regulación a través de este eje comienza con la secreción por parte del hipotálamo, de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que actúa directamente en la adenohipófisis, produciendo la síntesis y liberación de dos hormonas gonadotróficas o gonadotrofinas, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Finalmente, estas hormonas actúan sobre los testículos ejerciendo distintas acciones. La LH actúa sobre las células de Leydig regulando la síntesis de testosterona, mientras que la FSH actúa principalmente en las células de Sertoli, que se encuentran en el interior de los túbulos seminíferos, regulando el proceso de espermatogénesis. Asimismo, la testosterona regula su síntesis a través de distintas vías de retroalimentación negativa que actúan sobre el hipotálamo y la hipófisis (Waites, 1993).

### **6.1.1. Regulación del RAS testicular por las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario**

Uno de los puntos de control de la función reproductora masculina, como ya se ha expuesto, se produce a través del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, mediante la liberación de hormonas gonadotróficas, FSH y LH, que controlan la síntesis y secreción de testosterona. De igual forma, la síntesis y liberación de varios componentes del RAS están modulados por estas mismas hormonas.

#### **6.1.1.1. Efectos sobre el AGT y las angiotensinas**

Se ha observado que los niveles de AGT aumentan, de forma fisiológica, al inicio de la pubertad, con la aparición de la LH y la FSH en el torrente circulatorio (Parmentier *et al.*, 1983). Además, se ha observado que la administración de gonadotropinas exógenas, resulta en un aumento de la concentración de Ang II en el testículo (Okuyama *et al.*, 1988), así como en las células de Leydig (Pandey e Inagami, 1986).

#### **6.1.1.2. Efectos sobre los receptores del RAS local**

De igual forma que el AGT, los receptores de la Ang II también aumentan de forma fisiológica, al inicio de la pubertad, con la aparición de las hormonas gonadotróficas en el torrente circulatorio (Parmentier *et al.*, 1983). Contrariamente, también se ha observado que tras la supresión hipofisaria (hipofisectomía), la expresión de los genes que codifican para el AT1R y el AT2R aumentan significativamente, mientras que la administración de hCG (hormona gonadotrófica que desencadena las mismas acciones que la LH) y gonadotropina menopáusica humana reducen su expresión. Lo que sugiere que la expresión génica de los transcritos de estos receptores también es dependiente de la adenohipófisis (Hirai *et al.*, 1998).

#### **6.1.1.3. Efectos sobre las enzimas del RAS local**

Asimismo, tanto la renina como la ACE, son otros de los componentes del RAS cuyas concentraciones aumentan cuando se produce la secreción de LH y FSH en el torrente circulatorio al inicio de la pubertad (Naruse *et al.*, 1984; Parmentier *et al.*, 1983).

En relación a los efectos que produce la administración exógena de hormonas hipofisarias sobre las principales enzimas del RAS testicular, también se ha observado que la administración de gonadotropinas resulta en un aumento de la concentración de renina testicular, mientras que la supresión de éstas hace que disminuya (Okuyama *et al.*, 1988). El hecho de que las variaciones de los niveles de gonadotropinas no afecten de forma significativa a los niveles de renina plasmática, sustenta la existencia de una regulación independiente del RAS sistémico y el testicular (Paul *et al.*, 2006). En las células de Leydig, la formación de renina también está regulada por las gonadotropinas LH y hCG, observándose unos efectos similares a los descritos en el testículo, ya que la inmunoreactividad de la renina, es completamente eliminada tras la hipofisectomía y el tratamiento con estrógenos, mientras que su actividad aumenta tras la estimulación con gonadotropinas (Parmentier *et al.*, 1983; Pandey *et al.*, 1985). Además, el tratamiento de células de Leydig tumorales con hCG o LH bovina, resulta en un aumento de la renina (Pandey *et al.*, 1985; Pandey e Inagami, 1986). En consonancia con lo anteriormente expuesto, y en relación a la producción de testosterona, se ha visto que en varones tratados con hCG, al igual que produce un aumento de la renina, la actividad de la renina mantiene una correlación positiva con la testosterona. De forma que la hCG indirectamente produce un aumento de la testosterona (Parmentier *et al.*, 1983).

### **6.1.2. Regulación de la función testicular mediante el RAS local**

Además de la regulación endocrina, se conocen distintos mecanismos, paracrinos y autocrinos, que también modulan la función testicular a nivel local actuando sobre los distintos tipos celulares presentes en el testículo, entre los cuales se encuentra el RAS (Paul *et al.*, 2006). Uno de los tipos celulares sobre los que actúan estos mecanismos son las células de Leydig, que como ya se ha comentado, son las responsables de la producción de testosterona por parte del testículo. Tanto la testosterona como sus metabolitos, dihidrotestosterona (DHT) y estradiol, son las principales hormonas masculinas encargadas de regular la función reproductora. De hecho, los niveles de testosterona hallados en los túbulos seminíferos son 100 veces superiores a los detectados en sangre periférica y se deben a su producción en las células de Leydig (Morse *et al.*, 1973). Esta alta concentración de testosterona intratesticular resulta esencial para que la espermatogénesis se lleve a cabo correctamente. El otro tipo celular sobre el que actúan estos mecanismos son las células de Sertoli, las cuales, proporcionan un soporte metabólico y estructural

necesario para la diferenciación de las células germinales hasta espermatozoides (Waites, 1993).

### 6.1.2.1. Funciones del AGT y las angiotensinas sobre la función testicular

Tanto el AGT como su mRNA, están presentes en los testículos humanos y murinos, y más concretamente en las células de Leydig (Dzau *et al.*, 1987). Aunque en un principio se pensó que todo el AGT presente en los testículos provenía de la circulación sistémica, finalmente tras la detección del transcrito del AGT, se demostró que este era sintetizado en las células de Leydig. Observándose, además, diferencias en los niveles de expresión de su mRNA entre distintas especies (Dzau *et al.*, 1987; Speth *et al.*, 1999; Paul *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha observado en células de Leydig de testículos de varias especies, como en ratón, rata, primates no humanos y humano, tanto la presencia como la formación de Ang II y otros péptidos de angiotensina activos, tales como la Ang (1-7), al igual que la presencia de sus receptores característicos (Okuyama *et al.*, 1988; Alenina *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2010). En relación a la Ang II, se ha visto que los componentes necesarios para su formación (renina, ACE y Ang I) se localizan en el interior de las células de Leydig, lo que apoya su formación intracelular (Pandey e Inagami, 1986). En lo que respecta a su función, se ha demostrado que inhibe la producción de testosterona mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Khanum y Dufau, 1988; Leung y Sernia, 2003). En este mecanismo, la LH estimula la producción de Ang II en las células de Leydig, y esta Ang II actúa sobre estas mismas células inhibiendo la vía del cAMP. La inhibición de esta vía comienza con la inhibición de la actividad de la enzima adenilato-ciclasa, presente en la membrana de células de Leydig, produciéndose una menor cantidad de AMPc y testosterona (Khanum y Dufau, 1988). Sin embargo, la Ang II no ha sido detectada en el interior de los túbulos seminíferos, hecho que sugiere que no ejerce ninguna función directa en la formación de los gametos masculinos (Vinson *et al.*, 1997). Recientemente, estudios realizados en testículo de animales murinos, han sugerido que las Ang III y IV, podían ser las verdaderas encargadas de inhibir la producción testicular de testosterona, ya que se ha observado que las enzimas encargadas de formar estas angiotensinas, se relacionan con bajos niveles de testosterona (De La Chica-Rodríguez *et al.*, 2008; Martínez-Martos *et al.*, 2011).

Por último, la Ang-(1-7) también ha sido identificada y caracterizada en los testículos humanos, con independencia del estatus fértil del varón (Alenina *et al.*,

2002; Leal *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010). Concretamente, la Ang-(1-7) está presente en el citoplasma de las células de Leydig, y de una forma menos intensa en el interior de los túbulos seminíferos, predominando en el citoplasma de las células de Sertoli y en los espermatozoides primarios. A pesar de que no se conoce con exactitud las acciones de la Ang (1-7), se ha sugerido que por una parte podría estar implicada en la modulación de la producción de testosterona en testículo humano y por otra parte, debido a su localización en el interior del túbulo seminífero, podría actuar regulando la espermatogénesis (Reis *et al.*, 2010).

### **6.1.2.2. Funciones de los receptores del RAS sobre la función testicular**

En cuanto a los receptores de Ang II, tanto el AT1R como el AT2R, han sido detectados en las células de Leydig a nivel génico y proteico. Aunque, el AT1R se expresa de forma predominante (Speth *et al.*, 1999). Esto podría deberse a que tanto la concentración del AT1R y AT2R, como la de sus respectivos mRNAs, es dependiente de la edad. De forma que el AT2R predomina durante los primeros días de vida y posteriormente va disminuyendo de forma gradual, hasta que en la cuarta semana de edad, se encuentra casi de forma exclusiva el AT1R. Sin embargo, se desconoce si estos receptores desempeñan algún papel en la regulación de la formación de los testículos (Paul *et al.*, 2006). Por otra parte, hay que destacar que aunque en humanos únicamente se ha observado un único tipo del AT1R, en animales murinos se ha descrito la presencia dos subtipos, AT1AR y AT1BR. Siendo el AT1AR, el subtipo que se expresa de forma predominante en rata (Kitami *et al.*, 1992). Además, también se ha observado la presencia del AT1R en el interior de los túbulos seminíferos, y más concretamente en espermatozoides en distintos estadios madurativos (espermatogonias y espermatidas), tanto murinos como humanos (Vinson *et al.*, 1995a; Vinson *et al.*, 1995b). Por lo que el AT1R podría estar implicado tanto en la inhibición de la producción de testosterona, como en la espermatogénesis.

Finalmente, y al igual que su ligando, el MasR ha sido localizado en los testículos humanos, con independencia del estatus fértil del varón (Alenina *et al.*, 2002; Leal *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010). Este receptor ha sido observado en el citoplasma de células de Leydig, coincidiendo con la principal localización de su ligando, y en el interior de los túbulos seminíferos, siendo su expresión, igual de intensa a lo largo de todo el epitelio seminífero, desde la zona basal, donde se encuentran células de Sertoli y las espermatogonias, hasta la luz del túbulo, donde se localizan los

espermatozoides (Reis *et al.*, 2010). Además, también se ha detectado mRNA del MasR en las células de Leydig, y adicionalmente en las de Sertoli, siendo su expresión mucho más pronunciada en las primeras, aunque no ha sido detectado en las células germinales (Alenina *et al.*, 2002). A pesar de que no se conoce con exactitud las funciones de este receptor, se ha sugerido un posible papel en la modulación de la producción de testosterona en testículo humano (Reis *et al.*, 2010), al observarse que los ratones deficientes en el gen del MasR, aunque son fértiles (Walther *et al.*, 1998), presentan alteraciones en la actividad de los genes que codifican para las enzimas que intervienen en la esteroidogénesis testicular (Xu *et al.*, 2007; Alenina *et al.*, 2002). Por otra parte, su localización en el interior del túbulo seminífero y el hecho de que su expresión está alterada cuando la espermatogénesis está gravemente afectada, sugieren que puede actuar regulando de este proceso (Reis *et al.*, 2010).

### **6.1.2.3. Funciones de las enzimas del RAS sobre la función testicular**

En cuanto a la renina, se ha observado la presencia tanto del transcrito como de la proteína, en las células de Leydig de los testículos humanos y murinos (Naruse *et al.*, 1984; Speth *et al.*, 1999), evidenciando la síntesis local de esta enzima (Speth *et al.*, 1999; Paul *et al.*, 2006). Además, la cantidad de prorenina hallada en los vasos sanguíneos testiculares, es superior a la observada en sangre arterial, aunque curiosamente, la concentración de renina activa no es significativamente diferente (Craven *et al.*, 1981). Asimismo y en relación a la regulación de la síntesis de testosterona, como ya se ha explicado previamente, la administración de hCG resulta en un aumento de renina, que a su vez produce un aumento de la síntesis de testosterona (Parmentier *et al.*, 1983).

La ACE es otro de los componentes del RAS que ha sido localizado en los testículos. Se ha observado que las gónadas masculinas contienen una concentración de ACE muy elevada en comparación con las halladas en otros órganos (Cushman y Cheung, 1971). Curiosamente, en el testículo se han observado las dos isoformas de esta enzima, la isoforma somática (sACE) y la isoforma testicular (tACE), sin embargo, estas se encuentran en distintas localizaciones, cumpliendo diferentes funciones. Aunque estas dos isoformas se transcriben a partir de un mismo gen, presentan distintas estructuras moleculares. Así, la sACE está formada por dos subunidades idénticas, mientras que la tACE está formada por una única subunidad (Lattion *et al.*, 1989; Bernstein *et al.*, 1989). La transcripción de la isoforma testicular

es tejido específica, y se produce como resultado de fenómenos de splicing alternativo, inicio alternativo de la transcripción, y poliadenilación alternativa (Howard *et al.*, 1990; Hubert *et al.*, 1991; Kumar *et al.*, 1991; Thekkumkara *et al.*, 1992). La tACE, se diferencia estructuralmente de la sACE por la presencia de una secuencia de 66 aminoácidos (Ehlers *et al.*, 1989; Langford *et al.*, 1991). Además, estas dos isoformas también presentan distintos valores de vida media (Schunkert *et al.*, 1993). No obstante, a pesar de ser transcrita a partir de un mRNA más pequeño, la tACE posee una actividad enzimática equiparable a la sACE (Paul *et al.*, 2006). En cuanto a su expresión en las distintas poblaciones celulares del testículo, la isoforma testicular está presente únicamente en las células germinales masculinas (Cushman y Cheung, 1971; Pandey *et al.*, 1984), encontrándose en altas concentraciones durante la espermatogénesis. Por otra parte, la sACE se expresa en otras células testiculares, tales como las células de Leydig y las células endoteliales del tejido intersticial testicular (Pandey *et al.*, 1984; Paul *et al.*, 2006). De igual modo, tanto la ACE2 como su transcrito, han sido identificados en las células de Leydig de los testículos humanos, lo que concuerda con la identificación del péptido Ang (1-7) y su receptor MasR, (Donoghue *et al.*, 2000). Además, su presencia es independiente del estatus fértil del varón (Reis *et al.*, 2010). En cuanto a su mRNA, éste ha sido hallado en las células de Leydig y en las de Sertoli, siendo mucho más pronunciada su expresión en las primeras (Donoghue *et al.*, 2000; Alenina *et al.*, 2002).

La APA, por su parte, ha sido detectada en homogenados de testículo de rata, mostrando una alta actividad. Se ha sugerido que esta enzima estaría implicada en la inhibición de la esteroidogénesis a través de la producción de Ang III, la cual, al igual que la Ang II, estaría encargada de inhibir la producción de testosterona en las células de Leydig (De La Chica-Rodríguez *et al.*, 2008).

La NEP, también ha sido detectada en la membrana de las células de Sertoli, donde presenta una alta actividad enzimática (Monsees *et al.*, 1998) y, posteriormente en testículos humanos (Quimet *et al.*, 2000; Ghaddar *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2010). Estudios con ratones a los que se les había eliminado el gen que codifica para esta enzima, mostraron que a pesar de presentar una función testicular y espermática normal, tienen reducida su fertilidad, ya que muestran una menor eficiencia en la fecundación del oocito y los embriones resultantes presentan defectos en el desarrollo (Carpentier *et al.*, 2004). Del mismo modo, poco después, se observó la existencia de una isoforma de esta enzima en los testículos humanos y murinos, a

la que se denominó NEP2 (Pinto *et al.*, 2010). En estos estudios también se demostró la presencia del mRNA de la NEP2 en los túbulos seminíferos, concretamente en las células germinales en evolución y principalmente en las espermatidas (Ouimet *et al.*, 2000; Ghaddar *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2010).

La APN, ha sido localizada en el testículo de animales murinos, encontrándose altamente expresada en las células de Sertoli y de Leydig, mientras que en las células germinales, no se ha detectado su expresión génica (Osada *et al.*, 2001). Además, los ratones que carecen de la APN, son infértiles y presentan defectos en la espermatogénesis ya que poseen alterada la función de las células de Sertoli, lo que sugiere que la APN podría regular la función reproductora a nivel testicular (Osada *et al.*, 2001). Recientemente se ha observado que esta enzima está relacionada con la síntesis de testosterona, ya que su aumento ha sido asociado a la presencia de bajos niveles de testosterona, pudiendo estar implicada en la inhibición de su producción (Martínez-Martos *et al.*, 2011).

Finalmente, la APB, ha sido detectada en los testículos, y al igual que la APN, el aumento de su actividad ha sido relacionado con bajos niveles de testosterona, lo que sugiere su implicación en la inhibición de la producción de esta hormona (Martínez-Martos *et al.*, 2011).

En base a lo anteriormente expuesto, se puede decir que este RAS local está regulado por el eje hipotálamo-hipofisario-testicular, ya que variaciones en los niveles de gonadotrofinas, modulan la concentración testicular de renina y Ang II, los cuales son los principales elementos efectores de este sistema (Pandey *et al.*, 1985). Contrariamente, el tratamiento con gonadotrofinas, reduce la expresión de los genes que codifican para el AT1R y el AT2R, mientras que su eliminación, hace que aumente significativamente la expresión de estos receptores (Kitami *et al.*, 1992), lo que puede deberse a un mecanismo de compensación. En lo referente a la regulación de la producción de testosterona, se ha observado que las gonadotrofinas actúan sobre las células de Leydig aumentando la síntesis de renina, lo que indirectamente resulta en un aumento de la testosterona testicular (Parmentier *et al.*, 1983; Pandey *et al.*, 1985). Por otra parte, la producción de testosterona está regulada mediante un mecanismo de retroalimentación negativa desencadenado por la Ang II y en el que también se ha sugerido que pueden estar implicadas tanto las Ang III y IV como las enzimas APA, APN y APB (De La Chica-Rodríguez *et al.*, 2008; Martínez-Martos *et al.*, 2011). Otros componentes que

también regulan indirectamente la producción de testosterona, son la Ang (1-7) y su receptor, MasR, ya que su ausencia a nivel génico altera la actividad de los genes que codifican para las enzimas que intervienen en la esteroidogénesis testicular (Leal *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque la ACE y los receptores de Ang II, AT1R y AT2R, también han sido localizados en las células de Leydig, se desconoce si están implicadas en la producción de testosterona.

En cuanto a la regulación de la espermatogénesis, la presencia de Ang (1-7), su receptor MasR, ACE, NEP2 y APN en el interior de los túbulos seminíferos, tanto en las células germinales en formación como en las células de Sertoli, sugieren un posible papel de estas moléculas en la regulación de este proceso (Alenina *et al.*, 2002; Speth *et al.*, 1999; Bonvouloir *et al.*, 2001; Osada *et al.*, 2001). Por otra parte, aunque se ha observado la presencia de ACE2 en las células de Sertoli, su expresión es independiente del estatus fértil del varón (Reis *et al.*, 2010), por lo que *a priori*, no estaría implicada en este proceso.

## **6.2. El RAS y su implicación en la función espermática**

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 oocito (Yoshida *et al.*, 2008; Sakkas *et al.*, 2015). Estos procesos están regulados por la actuación conjunta de diversos mecanismos moleculares, entre los cuales se encuentra el RAS (Yoshida *et al.*, 2008; Vinson *et al.*, 1997; Speth *et al.*, 1999). Así, tanto la presencia y distribución de los componentes del RAS 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).

### **6.2.1. Funciones del AGT y las angiotensinas sobre la función espermática**

La Ang II ha sido detectada en el plasma seminal, en concentraciones de tres a cinco veces superiores a las halladas en el plasma sanguíneo (O'Mahony *et al.*, 2000). Sin embargo, la infertilidad masculina no parece estar relacionada con los bajos niveles de Ang II esperados en los ratones carentes del gen que codifica para la ACE, enzima encargada de la formación de la Ang II (Paul *et al.*, 2006). Se ha

descrito que la Ang II es un modulador de la actividad espermática, ya que está implicada en procesos como la movilidad y la reacción acrosómica (Foresta *et al.*, 1991; Vinson *et al.*, 1997; Gur *et al.*, 1998; Kohn *et al.*, 1998a; Wennemuth *et al.*, 1999; Sabeur *et al.*, 2000). En cuanto a su implicación en la movilidad, la Ang II aumenta tanto el porcentaje de espermatozoides móviles, como su velocidad lineal (Vinson *et al.*, 1996).

Aunque la Ang (1-7) no ha sido localizada en espermatozoides maduros, la existencia de su receptor sugiere que éstos podrían ser influidos por modificaciones en la producción local de este péptido (Reis *et al.*, 2010).

### **6.2.2. Funciones de los receptores del RAS sobre la función espermática**

En cuanto a los receptores específicos de la Ang II, el AT1R ha sido detectado en la cola de espermatozoides tanto murinos como humanos (Vinson *et al.*, 1995a; Vinson *et al.*, 1995b). Estudios con ratones, demostraron que la eliminación del AT1BR, resulta en una alta actividad transcripcional del AT1AR en las células espermáticas maduras e inmaduras, sugiriendo que el AT1AR puede realizar funciones específicas en estos animales o que hay otros receptores de Ang involucrados en este proceso (Paul *et al.*, 2006).

Se cree que el AT1R está implicado en la movilidad espermática, ya que el uso de antagonistas de este receptor, como el losartán, inhibe la movilidad, mientras que tras la adición de Ang II se produce un aumento tanto del porcentaje de espermatozoides móviles, como de su velocidad lineal (Vinson *et al.*, 1996). De igual manera, también se ha evidenciado su implicación en la reacción acrosómica, ya que tras la adición de captopril, inhibidor específico de la ACE, ésta queda inhibida (Foresta *et al.*, 1991; Gur *et al.*, 1998). Por su parte, el AT2R ha sido localizado en la región acrosomal de la cabeza de espermatozoides de ratón, aunque, por ahora, no se le ha atribuido ninguna función (Wennemuth *et al.*, 1999).

Finalmente, la presencia del MasR en espermatozoides humanos indica que estas células tienen la capacidad de responder a la Ang (1-7), y por lo tanto, podrían ser influidas por modificaciones en la producción local de este péptido (Reis *et al.*, 2010).

### 6.2.3. Funciones de las enzimas del RAS sobre la función espermática

El líquido seminal humano contiene prorrenina y renina activas en cantidades mayores que el plasma sanguíneo. Curiosamente, esta renina no proviene de los testículos, sino de la próstata u otras glándulas sexuales accesorias (Craven *et al.*, 1981). Por otra parte, se ha observado una correlación directa entre el contenido prorrenina seminal y la calidad seminal (densidad y movilidad espermática) (Mukhopadhyay *et al.*, 1995).

En cuanto a la ACE presente en el líquido seminal, se ha observado que se corresponde con la sACE (El-Dorry *et al.*, 1983; Speth *et al.*, 1999). Esto se debe a que no se sintetiza en el testículo, sino que es secretada al líquido seminal tras formarse en las células de los conductos deferentes. Por otra parte, la concentración de ACE del plasma seminal se correlaciona positivamente tanto con la concentración de espermatozoides como con su movilidad (Speth *et al.*, 1999), aunque paradójicamente, también se ha visto que los niveles de ACE del plasma seminal de varones con oligospermia son similares a los de varones normozoospermicos (Hohlbrugger *et al.*, 1984). En cuanto a su localización en los espermatozoides, la tACE está presente en la membrana plasmática de las espermátidas y espermatozoides de distintas especies (Vanha-Pertulla *et al.*, 1985; Brentjens *et al.*, 1986; Dobrinski *et al.*, 1997), principalmente en la membrana plasmática de la región acrosomal, en el segmento ecuatorial, en la región postacrosomal y en la pieza intermedia (Ganong, 1995; Kohn *et al.*, 1998b). Su actividad es baja en animales inmaduros pero va aumentando progresivamente conforme va alcanzando la madurez sexual, lo que sugiere que su presencia es dependiente de la maduración sexual (Jaiswal *et al.*, 1983). El mecanismo a través del cual la tACE participa en la función espermática todavía no se conoce en detalle, aunque, distintos estudios han demostrado su implicación en la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica y en la capacidad fecundante (Singh *et al.*, 1985; Foresta *et al.*, 1987; Foresta *et al.*, 1991; Kohn *et al.*, 1995; Shibahara *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2014). Estos efectos de la ACE sobre la fertilidad masculina, y atribuidos a la tACE, han sido corroborados mediante distintos estudios en animales, en los que mientras la eliminación de la sACE a ratones macho no afectaba a la fertilidad, los que carecen de ambas isoformas, sACE y tACE, muestran una fertilidad reducida, a pesar de que tanto el desarrollo testicular, como los espermatozoides y su movilidad, y la conducta de apareamiento son normales (Krege *et al.*, 1995; Esther *et al.*, 1996; Hagaman *et al.*, 1998).

Por su parte, la APA, ha sido hallada en el líquido seminal de varios animales como el toro y el jabalí, presentando una mayor actividad enzimática en este último, aunque no ha sido detectada en el líquido seminal humano (Agrawal y Vanha-Perttula, 1985).

La peptidasa NEP, ha sido localizada tanto en el líquido seminal como en los espermatozoides humanos (Fernández *et al.*, 2002; Irazusta *et al.*, 2004; Subirán *et al.*, 2008). En cuanto al líquido seminal, esta enzima, presenta una actividad y una concentración significativamente mayores que las observadas en otros tejidos corporales (Fernández *et al.*, 2002). Su actividad está alterada en varones astenozoospermicos en comparación con normozoospermicos (Irazusta *et al.*, 2004). En relación a los espermatozoides, ha sido detectada tanto a nivel génico como proteico, localizándose en el cuello de una pequeña proporción de espermatozoides humanos. Se ha observado que esta enzima está implicada en la regulación de la movilidad espermática, ya que su inhibición mejora la movilidad de los espermatozoides capacitados, aumentando los espermatozoides con movilidad progresiva (Subirán *et al.*, 2008).

Finalmente, la APN muestra una amplia distribución tanto en el líquido seminal como en los espermatozoides humanos (Fernández *et al.*, 2002; Irazusta *et al.*, 2004; Subirán *et al.*, 2008). En cuanto al líquido seminal, al igual que la NEP, presenta una actividad y una concentración significativamente mayores que las observadas en otros tejidos corporales (Fernández *et al.*, 2002). Su actividad está alterada en varones astenozoospermicos en comparación con normozoospermicos (Irazusta *et al.*, 2004). En relación a los espermatozoides, esta enzima ha sido detectada tanto a nivel génico como proteico (Subirán *et al.*, 2008), localizándose en la membrana plasmática del segmento ecuatorial de la región postacrosomal de la cabeza espermática, en el cuello y uniformemente distribuida a lo largo de la cola (Subirán *et al.*, 2008). En estudios con espermatozoides de mejillón, se observó que la APN podría estar implicada en la reacción acrosómica, ya que interacciona con moléculas presentes en la membrana del oocito, induciendo así, la liberación del contenido acrosomal (Togo y Morisawa, 1997; Togo y Morisawa, 2004). Posteriormente se observó que regula la movilidad espermática, ya que su inhibición mejora la movilidad de los espermatozoides capacitados, aumentando la movilidad progresiva lineal (Subirán *et al.*, 2008; Subirán *et al.*, 2010).

En resumen, considerando lo anteriormente expuesto, se puede observar como el RAS participa en la regulación de la función espermática a través de los efectos que ejercen sus distintos componentes sobre los espermatozoides. En cuanto a la regulación por las distintas Ang y sus receptores, se ha descrito como la Ang II, probablemente a través de su unión al AT1R, modula la actividad espermática, estando implicada en la movilidad y la reacción acrosómica. Así, la Ang II aumenta tanto el porcentaje de espermatozoides móviles, como su velocidad lineal, y además, sus antagonistas inhiben tanto la movilidad como la reacción acrosómica (Wennemuth *et al.*, 1999; Foresta *et al.*, 1991; Vinson *et al.*, 1996; Gur *et al.*, 1998; Sabeur *et al.*, 2000). Sin embargo, aunque el AT2R, la Ang (1-7) y el MasR, han sido localizados en los espermatozoides se desconoce las funciones que desempeñan (Wennemuth *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2010). Del mismo modo, se ha observado como distintas enzimas presentes en los espermatozoides se encuentran relacionadas con procesos como la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica y la capacidad de fecundar a los oocitos. La tACE ha sido localizada en la membrana plasmática de las espermátidas y espermatozoides, y se considera una enzima muy relevante en la fertilidad masculina debido a su implicación en la capacitación, la reacción acrosómica y en la capacidad fecundante (Singh *et al.*, 1985; Foresta *et al.*, 1987; Foresta *et al.*, 1991; Kohn *et al.*, 1995; Shibahara *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2014). Asimismo, la NEP y la APN, están involucradas en la regulación de la movilidad espermática, ya que su inhibición mejora la movilidad de los espermatozoides capacitados, aumentando el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva (Subirán *et al.*, 2008; Subirán *et al.*, 2012). Pero además de estar relacionada con la movilidad espermática, se ha visto que la APN, interacciona con moléculas presentes en la membrana del oocito, de forma que también participa en la inducción de la reacción acrosómica (Togo y Morisawa, 1997; Togo y Morisawa, 2004).

### 6.3. Conclusiones

El RAS se encuentra presente en distintos órganos y tejidos del aparato reproductor masculino, regulando la función reproductora masculina a varios niveles, a través de mecanismos endocrinos, paracrinicos y autocrinos. El hecho de que se hayan localizado distintos elementos pertenecientes tanto al eje clásico, como a los tres ejes o vías alternativas del RAS, sugiere que todas estas vías podrían estar presentes en el aparato reproductor masculino. Por otra parte, se ha demostrado que los componentes de este sistema, están regulados por el eje hipotálamo-

hipofisario-testicular, ya que son sensibles a distintas hormonas sexuales y gonadotropinas. Centrándonos en el testículo, los distintos componentes del RAS están implicados en la regulación de la función testicular mediante mecanismos paracrinós y autocrinos, que actúan sobre los distintos tipos celulares presentes en el testículo. Así, se han encontrado distintos componentes del RAS tanto en las células de Leydig y de Sertoli, como en las células germinales en distintos estadios madurativos, lo que indica que estos componentes pueden modular tanto la producción de testosterona como la espermatogénesis. Finalmente a nivel seminal, se ha observado que el contenido de prorenina y de la ACE seminal está correlacionado con la densidad y movilidad espermática seminales. En cuanto a la función espermática, el RAS está implicado en la regulación de procesos esenciales de la fertilidad masculina, como son la movilidad de los espermatozoides, la reacción acrosómica, o la capacidad fecundante del oocito.

Por lo tanto, se puede observar como el RAS está implicado en varios procesos vitales de la fertilidad masculina, como la producción de testosterona, la espermatogénesis y la función espermática. Sin embargo, actualmente se desconocen varios aspectos como: 1) si todos los elementos del RAS están presentes tanto en el testículo, como en los espermatozoides y el líquido seminal y las funciones que ejercen en ellos; 2) si los distintos componentes cumplen algún papel en la regulación de la formación de los testículos; 3) si los distintos elementos del RAS hallados en el líquido seminal tienen alguna función sobre la supervivencia y/o el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino; y 4) si estos componentes encontrados varían en relación a distintas condiciones patológicas. Por lo que sería necesaria la realización de diversos estudios que ayudasen a responder estas cuestiones, de forma que permitiesen un mayor conocimiento de las funciones del RAS tanto en el aparato reproductor masculino, como en los espermatozoides. A su vez, el estudio de los distintos elementos del RAS presentes en los espermatozoides, podría esclarecer su papel tanto en la fisiología espermática como en la fertilidad masculina, a la vez que podría ayudar a establecer biomarcadores que permitiesen seleccionar los mejores espermatozoides a usar en las TRA.





## **II. OBJETIVOS**



Actualmente, se estima que la infertilidad afecta a un 15% de las parejas en edad reproductiva, estando implicado el varón en la mitad de los casos. El desarrollo de las TRA supuso una gran revolución en el tratamiento de la infertilidad al aumentar las posibilidades de tratamiento efectivo. A día de hoy, el análisis del semen constituye la única herramienta para evaluar el estatus fértil del varón. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones sobre todo en los casos de infertilidad de origen desconocido. En este sentido, cada vez hay más evidencias que indican que los espermatozoides no son meros portadores de la información genética paterna, sino que distintos componentes moleculares espermáticos podrían contribuir tanto en el proceso de fecundación, como en el desarrollo embrionario. Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, el uso de biomarcadores espermáticos podría complementar los análisis actuales mejorando el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina, o prediciendo los resultados de las TRA.

El RAS es un sistema molecular que participa en la regulación de la fertilidad masculina a múltiples niveles, razón por la cual, podría ser considerado como una posible diana terapéutica. A pesar de que se ha determinado la existencia de varios elementos de este sistema en espermatozoides humanos, todavía quedan algunas cuestiones por resolver en cuanto a la presencia y funciones de este sistema en la fisiología espermática. Concretamente, la Ang II ha sido descrita como el principal péptido efector de este sistema, y tras el descubrimiento de los RAS locales e intracelulares, la renina también pasó a ser considerada uno de los péptidos más trascendentes de este sistema. Sin embargo, ni el AT2R ni el PRR han sido estudiados en los espermatozoides humanos, por lo que se quiso determinar su presencia en los gametos masculinos, así como su relación con los distintos parámetros tenidos en cuenta durante los tratamientos de fecundación *in vitro*.

Por otra parte, las enzimas ACE y APN han sido extensamente estudiadas en relación a la fertilidad masculina. Se ha descrito que la tACE es esencial para el proceso de fecundación oocitaria, además de estar implicada en otras funciones espermáticas, mientras que la APN participa en la movilidad y la reacción acrosómica. Teniendo en cuenta su relevancia en la función espermática, se quiso abordar la relación de estas enzimas con los distintos parámetros tenidos en cuenta durante los tratamientos de fecundación *in vitro*.

# 1. Objetivo general

Esta tesis se ha centrado en aumentar el conocimiento del papel del RAS en la fisiología espermática, así como en determinar su posible uso como biomarcador diagnóstico o pronóstico de las TRA con el objetivo de mejorar el diagnóstico y/o tratamiento por parte de los/as profesionales que llevan a cabo el manejo de la infertilidad humana.

## 1.1. Objetivos específicos

1. Describir la presencia de los receptores AT2R y PRR en los espermatozoides humanos.
2. Relacionar los distintos elementos del RAS estudiados en los espermatozoides con los parámetros seminales y las distintas etiologías seminales, para ver su implicación en la calidad espermática así como para determinar su posible uso como biomarcadores de diagnóstico de la patología seminal.
3. Relacionar los distintos elementos del RAS estudiados en los espermatozoides con las tasas de fecundación y la calidad, el desarrollo, la viabilidad y el destino final de los embriones, para determinar su posible uso como marcadores predictivos de estos parámetros o como biomarcadores de selección espermática.
4. Relacionar los distintos elementos del RAS estudiados en los espermatozoides con la transferencia, el embarazo bioquímico, la implantación y la gestación clínica, para determinar su posible uso como biomarcadores predictivos de los resultados de las diferentes técnicas de fecundación *in vitro*.





## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



Este trabajo se divide en cuatro partes, en las que se plantean distintos objetivos de estudio.

El **objetivo 1** se centra en el estudio de la expresión y localización del AT2R y del PRR en espermatozoides humanos.

Los **objetivos 2, 3 y 4** se centran en relacionar distintos componentes del sistema renina angiotensina (AT2R, PRR, tACE y APN) con: 1) los parámetros seminales, 2) los parámetros embrionarios y 3) los resultados de las TRA. Se denomina ciclo de fecundación *in vitro* al periodo comprendido entre el inicio del tratamiento reproductivo hasta su finalización.

Debido a las implicaciones éticas referentes a los derechos de los pacientes, el proyecto fue aprobado por el “Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del la Universidad del País Vasco”, con código (CEISH/61/2011). Además, todas las parejas incluidas en este estudio fueron detalladamente informadas y se les entregó un consentimiento informado.

# Criterios de inclusión, análisis y preparación de las muestras seminales

## 0.1. Criterios de inclusión

Todas las muestras seminales usadas en este estudio, tanto en el objetivo 1 como en los objetivos 2 y 3, eran muestras seminales en fresco, obtenidas el mismo día de la realización de las técnicas de fecundación *in vitro*. Sin embargo, las muestras cumplían distintas características en función del objetivo para el que se fuesen a usar. Además todas las muestras procedían de pacientes de la Clínica IVI Bilbao.

En el **objetivo 1** se incluyeron muestras seminales de pacientes cuyos parámetros estaban dentro de los rangos de normalidad establecidos por la OMS (OMS, 2010). Para estos estudios se usaron un total de 23 muestras seminales.

Para los **objetivos 2, 3 y 4** se incluyeron un total de 173 muestras seminales de varones cuyas parejas se sometieron a ciclos de fecundación *in vitro* con oocitos de donantes (ovodonación). Estas muestras fueron recogidas entre Febrero de 2014 y Julio de 2015.

Las características de las muestras seminales incluidas en los objetivos 2, 3 y 4, fueron las siguientes:

- 1) provenían de ciclos de ovodonación, ya que de esta manera se reducía la variabilidad dentro de los oocitos y se minimizaba la infertilidad femenina como factor de sesgo.
- 2) procedían de sémenes en fresco, los cuales, una vez procesados, debían tener un volumen y una concentración mínima de 500  $\mu$ L y 5 millones de espermatozoides por mililitro.
- 3) las muestras de espermatozoides no debían de haber sido pasadas por una columna Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) de Anexina-V.
- 4) para la realización de los análisis moleculares se usaron fracciones alícuotas de las muestras de espermatozoides utilizadas en las TRA.

## 0.2. Determinación de las características seminales.

### Elaboración del espermiograma

Todas las muestras se obtuvieron por masturbación, tras un periodo de abstinencia sexual de 3 a 5 días, y depositadas en un contenedor estéril. A continuación, se trasladaron al laboratorio acompañadas de una hoja de solicitud en la que estaban anotados una serie de detalles clínicos importantes. Posteriormente, se dejaron durante un periodo de 10-15 minutos, hasta su total licuefacción en un incubador a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido este tiempo, se valoraron las características macroscópicas y microscópicas. Las características macroscópicas que se deben analizar en el eyaculado son: el aspecto, la licuefacción, el color, la viscosidad, el pH y el volumen. En cuanto al examen microscópico de la muestra, se valora la concentración espermática, la movilidad, la morfología así como la presencia de otros elementos celulares, como leucocitos o células germinales inmaduras, y detritos. Los parámetros microscópicos más importantes y que más ayudan a la determinación del potencial fértil del varón son el volumen, la concentración, la movilidad y la morfología. Estos tres parámetros se determinan de *visu*.

Por lo que los parámetros de mayor interés en este estudio fueron, el volumen, la concentración, movilidad y morfología espermática. Estos parámetros se determinaron en distintos momentos del análisis del semen, 1) en las muestras de eyaculado o del semen en fresco y 2) tras el procesado de la muestra, también denominada la recuperación de espermatozoides que posteriormente fueron usados en las TRA.

#### 0.2.1. Determinación de los parámetros básicos del semen

**Volumen:** El volumen del eyaculado es un parámetro esencial en cualquier evaluación seminal, ya que permite conocer el número total de espermatozoides en el eyaculado. Este parámetro se determinó midiendo el total del volumen eyaculado con una pipeta graduada estéril.

**Concentración:** La concentración da una idea del número de espermatozoides por mililitro de eyaculado. La determinación de la concentración espermática se realizó por conteo en una cámara de recuento de Makler® (Sefi Laboratories) y visualización en un microscopio óptico de contraste de fases. La cámara Makler®

sirve para realizar seminogramas, y está compuesta de dos piezas de cristal planas, que al superponerse dejan un espacio en el que la muestra se distribuye uniformemente además de permitir el movimiento de los espermatozoides. De forma que la parte superior sirve de cubreobjetos, mientras que la inferior está subdividida en 100 microcuadrados de 0,1 x 0,1 mm de lado. El número de espermatozoides contenidos en cualquier línea de 10 microcuadrados, indica la concentración en millones por mililitro. Para la determinación de este parámetro se utilizó un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de muestra, se contó el número de espermatozoides presentes en 30 microcuadrados y se realizó una media, dando como resultado el número de millones de espermatozoides por mililitro.

**Movilidad:** La determinación de este parámetro se realizó *in visu*, mediante el conteo y evaluación del tipo de movilidad de 100 espermatozoides móviles libres observados al azar. Según la última clasificación de la OMS, las muestras de semen se dividen en tres categorías en función del tipo de movilidad que muestran los espermatozoides (Tabla 9). De esta forma, los resultados de movilidad se dieron como porcentajes de espermatozoides de cada uno de los tipos de movilidad descritos.

Tipos de movilidad espermática	
Tipo movilidad	Descripción
<b>Movilidad progresiva (PR)</b>	espermatozoides con un movimiento activo, de forma rectilínea o en curvilínea amplia, sin tener en cuenta la velocidad
<b>Movilidad no progresiva (NP)</b>	espermatozoides con patrones de movimiento que no tienen progresión
<b>Inmovilidad (IM)</b>	espermatozoides inmóviles, sin ningún tipo de movimiento

**Tabla 9.** Tipos de movilidad espermática descritos en el 5º manual de la OMS (OMS, 2010).

**Morfología:** Una buena morfología espermática es necesaria para que el espermatozoide pueda tener una movilidad óptima y sea capaz de fecundar el oocito. La determinación de la morfología espermática requirió de la preparación de una extensión de la muestras de semen en fresco. Estas extensiones se dejaron

secar al aire, se fijaron y por último se contrastaron mediante tinción de Panóptico rápido. Las muestras se observaron en el microscopio óptico con el objetivo de 100x y aceite de inmersión. La morfología se determinó mediante el método de clasificación normal/anormal. Se contaron un total de 200 espermatozoides para la estimación del porcentaje de formas normales. Los espermatozoides considerados como normales debían cumplir una serie de características, las cuales están descritas en la tabla 10.

Características morfológicas espermáticas	
Localización morfológica	Descripción de las características
<b>Cabeza</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- lisa, con un contorno regular y generalmente de forma ovalada</li> <li>- región acrosomal bien definida que ocupe del 40-70% de la cabeza, que no contenga vacuolas grandes o más de dos vacuolas</li> <li>- región postacrosomal exenta de vacuolas</li> </ul>
<b>Pieza media</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- delgada, regular y aproximadamente de la misma longitud que la cabeza</li> <li>- eje central de la pieza media alineado con el eje central de la cabeza</li> <li>- cantidad de citoplasma residual reducida</li> </ul>
<b>Cola</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- estrecha y de diámetro uniforme</li> <li>- aproximadamente 45 <math>\mu\text{m}</math> de longitud (10 veces la longitud de la cabeza)</li> <li>- puede formar una curva, pero nunca un ángulo agudo que indique rotura flagelar</li> </ul>

**Tabla 10.** Descripción de las características que debe cumplir un espermatozoide con morfología normal según los criterios descritos en el 5º manual de la OMS (OMS, 2010).

Por último, y en relación a los parámetros anteriormente evaluados, a cada muestra se le asignó una etiología, acorde a la nomenclatura propuesta por la OMS (OMS, 2010) y anteriormente explicada.

### 0.3. Procesamiento de las muestras seminales

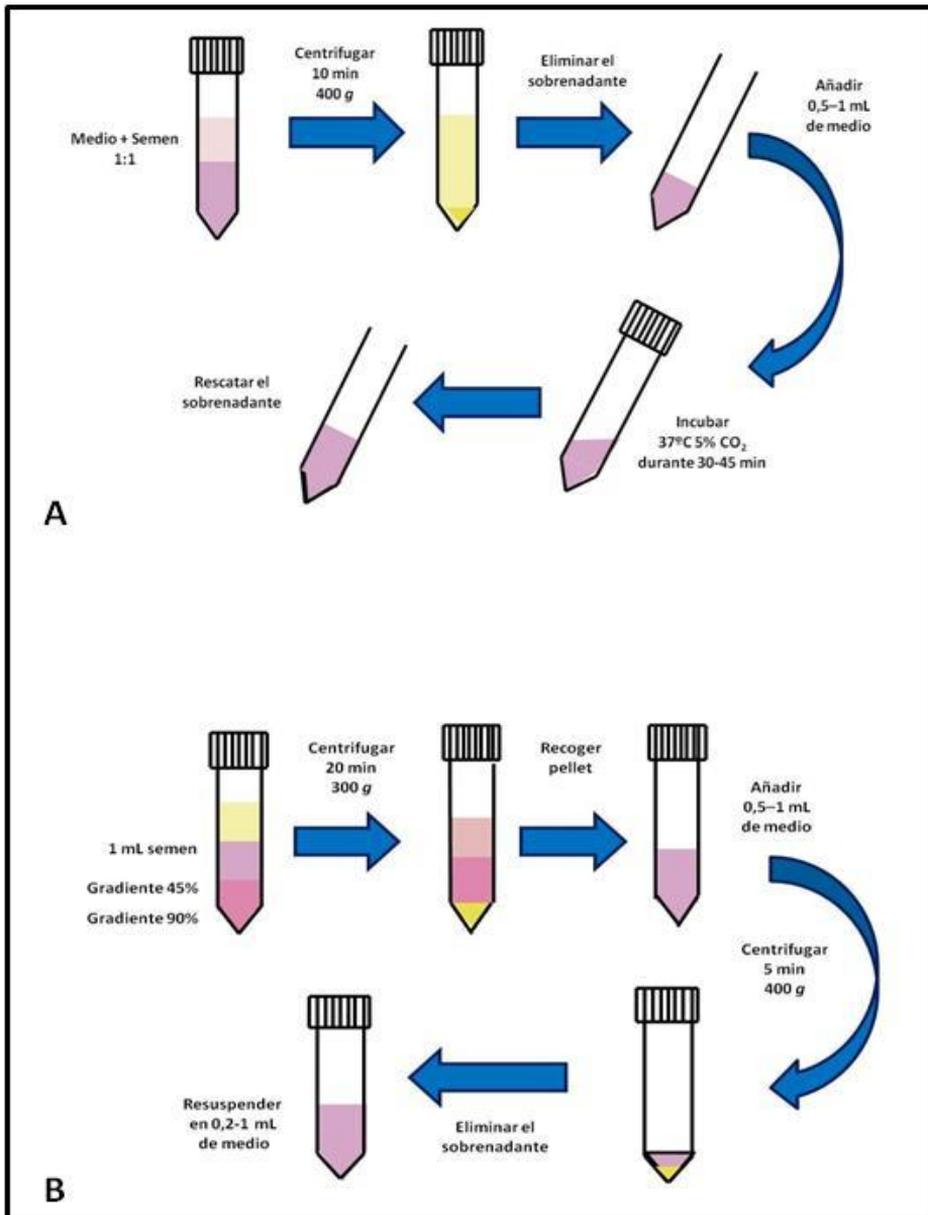
La recuperación de los espermatozoides se llevó a cabo mediante dos técnicas distintas, el swim-up y los gradientes de densidad (Figura 10). Estas técnicas permiten obtener espermatozoides con capacidad fecundante y eliminar los espermatozoides muertos, inmóviles o lentos, así como cualquier otro tipo celular e impureza.

#### 0.3.1. Procesamiento de las muestras mediante swim-up

El *swim-up* es una técnica muy sencilla que se basa en la recuperación de los espermatozoides más móviles gracias a su capacidad de nado hacia un medio más enriquecido. Para su realización se prepararon diluciones 1:1 (vol/vol) de las muestras seminales con medio *Global® for Fertilization* (LifeGloval Group). A continuación se realizaba una centrifugación a 400g durante 10 minutos, tras la cual se eliminaba el sobrenadante, y se añadía un volumen de 0,5-1 mL de medio *Global® for Fertilization* en la parte superior, teniendo cuidado de que no se mezclase con el pellet. Las muestras se dejaban incubando con una inclinación de 45°, a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 30-45 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se recogía un volumen de 0,1-0,5 mL de la capa superior, donde se encontraban los espermatozoides móviles, siendo esta fracción la usada en las TRA (Figura 10A).

#### 0.3.2. Procesamiento de las muestras mediante gradientes de densidad

La recuperación de espermatozoides mediante *gradientes de centrifugación* se basa en la selección de los espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presentan los gradientes de 45 y 90% y llegar hasta el fondo del tubo. Para ello se realizaron unos gradientes de densidad de 45 % y 90% con *PureSperm* (Nidacon) y medio *Global® for Fertilization*. En un tubo de 10 mL, se añadía primero la solución de densidad de 90% y encima, con cuidado de no mezclarlas, la solución de 45% de densidad. Una vez elaborado el tubo con el gradiente de densidad, se añadía 1 mL de muestra seminal y se centrifugaba a 300g durante 20 minutos. Terminada la centrifugación, se recogía el pellet con una pipeta Pasteur de vidrio estéril, se diluía con 2 mL de medio *Global® for fertilization*, y se centrifugaba a 400g durante 5 minutos, para eliminar los restos de los gradientes de la muestra. Finalmente, se eliminaba el sobrenadante y se diluía el pellet en un volumen de 0,2-1 mL de medio *Global® for fertilization*, siendo ésta muestra la usada en las TRA (Figura 10B).



**Figura 10.** Esquema en el que se muestran los pasos a seguir para el procesamiento de las muestras de semen mediante las técnicas de: **A)** swim-up y **B)** gradientes de densidad.

### **Objetivo 1: Estudio de expresión y localización de AT2R y PRR en espermatozoides humanos.**

En este apartado además de las muestras seminales, se utilizaron como controles positivos en las diferentes técnicas, muestras de riñón humano y una línea de células renales, también de origen humano (RC-124) (CLS, Cell Lines Service). El tejido renal se obtuvo del Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital de Cruces. En el Anexo II se detallan, los reactivos y materiales de laboratorio, así como los equipos y programas informáticos usados en las diferentes técnicas experimentales.

#### **1.1. Real Time RT-PCR**

El estudio de la presencia de los transcritos de los distintos componentes del RAS se realizó usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa ó RT-PCR. La RT-PCR es una variante de la PCR, en la que, una hebra de RNA es retrotranscrita a DNA complementario (cDNA) usando la enzima transcriptasa inversa. Posteriormente este cDNA es amplificado mediante una PCR tradicional. Se trata de una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de RNA muy bajo. Una característica muy interesante de este proceso es que al transcribirse a partir de RNA, el cDNA generado no contiene los intrones que sí tendría el DNA original, formándose un RNAm compuesto exclusivamente por exones.

##### **1.1.1. Extracción y purificación del RNA**

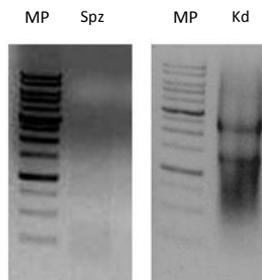
El RNA total de los espermatozoides tras ser procesados, mediante gradientes de centrifugación o swim-up, y de la línea celular de riñón humano (usada como control positivo), fue aislado mediante el Kit Nucleo Spin RNA II (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit incluía un paso de digestión, en el que se usó el Kit RNase-free DNase (QUIAGEN), con el que se eliminaba cualquier contaminación con DNA genómico. Finalmente, se eluyó el RNA. Para ello, se añadieron 30 µL de agua mili-Q, y se dejó 5 minutos para que empapase bien la

membrana con el RNA, tras lo cual se centrifugó la columna durante 1 minuto a 11.000g, obteniéndose de esta forma el RNA de la muestra.

Finalmente, se calculó espectroscópicamente la concentración de RNA y la pureza de la muestra mediante el uso del NanoDrop®ND-1000 (Thermo Scientific). La concentración de RNA se obtuvo midiendo la absorbancia a 260nm de la muestra de RNA obtenido por filtración, mientras que la pureza se determinó mediante cálculo del ratio 260/280nm.

### 1.1.2. Control de calidad del RNA

La integridad del RNA extraído se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa. El RNA total extraído de espermatozoides, y de la línea celular de riñón humano (usada como control positivo), fue cargado en un gel del 1% de agarosa teñido con *Midori green* (Nippon Genetics Europe GmbH) y migrado a 75V. El RNA extraído del control positivo debía poseer dos bandas discretas bien diferenciadas correspondientes a los rRNA 18S y 28S. Este perfil es característico de RNAs no degradados. En espermatozoides, en cambio, debido a que durante su maduración se pierde la mayor parte de los componentes citoplasmáticos, el RNA no presenta las bandas correspondientes a los rRNA 18S y 28S. Sin embargo, su perfil característico muestra un gradiente continuo de RNAs (Ostermeir *et al.*, 2002) (Figura 11).



**Figura 11.** Análisis electroforético de la calidad del RNA extraído de los espermatozoides (Spz) y de la línea celular renal usada como control positivo (Kd). MP: marcadores de pesos moleculares.

### 1.1.3. Retrotranscripción (síntesis de cDNA)

La síntesis de la cadena de cDNA se realizó usando el Kit Superscript II (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se partió de de RNA total, al

que se le añadieron 1  $\mu\text{L}$  de *random primers* (Random hexameres), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (10 mM) y agua mili-Q hasta un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . La mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos en el termobloque y seguidamente se puso a 4°C para deshacer posibles estructuras secundarias de las cadenas de RNA. Seguidamente, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se le dio un pulso en la centrifuga. A continuación, se añadió la mezcla de reacción, que consistía en: 4  $\mu\text{L}$  de tampón de síntesis de cDNA (5x First Strand Buffer), 2  $\mu\text{L}$  de DTT (0,1 M) y 1  $\mu\text{L}$  de la RNase OUT (Invitrogen). Se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añadió 1  $\mu\text{L}$  de transcriptasa inversa (SuperScript II RT), se mezclaron de nuevo todos los componentes y se introdujeron en el termociclador (MyCycler™, Bio-Rad). Para la reacción de retrotranscripción, la mezcla se incubó 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C, 15 minutos a 70°C, y finalmente se congeló a -20°C. La fracción del cDNA resultante de las reacciones de RT se guardó en fracciones alícuotas a -20°C hasta su posterior uso.

### 1.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El cDNA resultante de las reacciones de RT se utilizó como molde para su amplificación por PCR. Para la realización de la qRT-PCR se utilizó el *SYBR® Green master mix* (Applied Biosystem, Life Technology), que contiene un buffer, dNTPs, DNA polimerasa termoestable y marcador verde SYBR®. Para cada reacción se empleó 0,25  $\mu\text{L}$  de cDNA, 6,25  $\mu\text{L}$  de SYBR Green 0,125  $\mu\text{L}$  del primer *forward* y 0,125  $\mu\text{L}$  del primer *reverse* y agua mili-Q hasta un volumen total de 12,5  $\mu\text{L}$ . Cada muestra analizada se midió por triplicado. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABIPrism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Life Technology). La reacción de PCR se programó en función de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los primers y de la longitud del fragmento a amplificar, resultando de la siguiente forma: 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, seguidos de una fase de hibridación y extensión de 1 minuto a 60°C, y finalmente a 4°C. Posteriormente, el cDNA resultante se congeló a -20°C.

La presencia de DNA amplificado se determinó por electroforesis a 75V en gel de agarosa al 1,5%, teñido con *Midori green* (Nippon Genetics Europe GmbH). Por cada 20  $\mu\text{L}$  de muestra, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de tampón de carga. El tamaño del amplicón obtenido se verificó por comparación con un marcador de pesos de DNA (EZ Load 100 bp Molecular Ruler, Bio-Rad). Como control positivo se usaron los

productos obtenidos de la línea celular de riñón humano, mientras que como control negativo se analizaron los primers sin cDNA.

Los primers específicos para los diferentes componentes del RAS fueron diseñados usando el software Primer 3. Para ello, previamente se obtuvo la secuencia nucleotídica de la proteína. La secuencia de los primers estaba en los exones característicos de cada proteína en cuestión. Las condiciones de diseño de los primers fueron las siguientes: la longitud del primer debía estar entre 18 y 27 pares de bases (pb), con una temperatura de melting (tm) que oscilara entre 59-61°C y con un producto de PCR de entre 150 y 200 pb. Una vez realizados los primers, se evidenció la especificidad mediante la comprobación de su homología en BLAST. Los primers usados se detallan en la Tabla 11.

Proteína	Gen		Secuencia (5' a 3')	Tamaño amplicón
AT2R	<i>Agtr2</i>	FW	TTA TGG CTT TCC CAC CTG AG	177 pb
		RV	GGA CTT GGT CAC GGG TTA TC	
PRR	<i>ATP6AP2</i>	FW	TGG TAG GGA AGG CAA ACT CA	151 pb
		RV	TCA GAA AGA AAG AGC AGG TCA A	
ACTB	<i>ACTB</i>	FW	GGC ACC CAG CAC AAT GAA G	178 pb
		RV	CCG ATC CAC ACG GAG TAC TTG	

**Tabla 11.** Tabla en la que se muestran los distintos primers usados para la RT-PCR.

## 1.2. Western blot (Inmunoblotting)

La técnica de western blot se utiliza para la identificación de proteínas presentes en una muestra. Además, permite semicuantificar proteínas procedentes de diferentes muestras. Se basa en: 1) la separación de las proteínas, en base a su peso molecular, mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes, 2) la transferencia de las proteínas a una membrana y 3) la posterior detección de la proteína de interés con anticuerpos específicos.

### 1.2.1. Preparación de las muestras

Los extractos proteicos que fueron usados pertenecían a muestras de riñón y espermatozoides de origen humano. Para la extracción de las proteínas de las muestras, estas fueron procesadas de la manera más apropiada de acuerdo a su origen, tisular o celular.

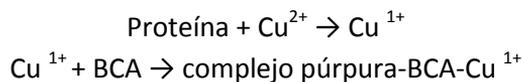
Las muestras de *espermatozoides*, se pasaron por el homogenizador-dispersador Ultraturrax (ART) durante un minuto y posteriormente se sometieron a una homogeneización mecánica más fina, usando para ello un homogeneizador con émbolo de teflón (Heidolph Giralt). Tras ello, se dejó incubando el homogenado en hielo durante una hora en movimiento. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron sonicadas (Labsonic® P, B. Braun Biotech International). La sonicación consistió en 2 ciclos de 10 pulsos de 0,5 segundos a 40% de amplitud con un intervalo de 30 segundos entre los ciclos. Durante este procedimiento las muestras se mantuvieron en hielo evitando así su calentamiento, lo que conllevaría a degradación proteica. Una vez sonicadas, se centrifugaron a 16.200g durante 15 minutos a 4°C. Finalmente se seleccionó el sobrenadante. En el caso del *tejido renal*, éste se cortó con un bisturí en trozos de unos 1 x 1 mm, y se seccionó mecánicamente mediante un homogenizador-dispersador Ultraturrax (ART) durante un minuto para cortar el tejido en trozos más pequeños. Posteriormente se sometió a una homogeneización mecánica utilizando para ello un homogeneizador con émbolo de teflón (Heidolph Giralt). Se dejó incubando el homogenado en hielo durante una hora en movimiento y seguido se centrifugó a 16.200g durante 15 minutos a 4°C. Finalmente se seleccionó el sobrenadante, ya que en esta fracción se encontraban las proteínas.

Tanto las muestras seminales como las de tejido renal, se homogeneizaron con tampón de lisis RIPA (Sigma) al que se le añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) para evitar cualquier degradación proteica. Además, en las muestras de espermatozoides se añadió al tampón de lisis, inhibidores de fosfatasa (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 y Phosphatase Inhibitor Cocktail 3, Sigma), RNasa (RNase A, Quiagen) y DNasa (RNase-free DNase Set, Quiagen) para la eliminación de DNA y RNA de las muestras.

### 1.2.2. Cuantificación de proteínas mediante el método de BCA

Para medir la concentración de proteína presente en las muestras, se usó el método del ácido bicinonínico (BCA). Esta sal sódica es un compuesto capaz de formar un complejo de color púrpura con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ion  $\text{Cu}^{1+}$  en una reacción entre las proteínas y el  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas sencillo, rápido y muy sensible. Este complejo púrpura tiene un máximo de absorbancia a 562nm. Esta absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la proteína.

La reacción que se produce es:



La concentración de proteínas en las muestras de estudio se calculó mediante la extrapolación de los datos de absorbancia a una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) de concentración conocida (1 mg/mL). Las muestras se diluyeron 2 veces en el caso de los espermatozoides y 15 veces en el caso del tejido renal, ya que normalmente las proteínas se encontraban tan concentradas que su valor se salía de la recta patrón. Se mezclaron con el reactivo BCA que se constituye de 50 volúmenes de BCA (Bicinchoninic acid solution, Sima-Aldrich) y 1 volumen de  $\text{CuSO}_4$ , cuyo cobre, en función de la concentración de proteína pasa de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ . Una vez preparados los tubos de la recta patrón y de las proteínas, se mantuvieron a 37°C durante 30 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Shimadzu) a 562nm. Todas las muestras se midieron por duplicado.

### 1.2.3. Electroforesis (SDS-PAGE)

Las proteínas presentes en la muestra se separaron en base a su peso molecular, en condiciones desnaturalizantes, mediante electroforesis unidimensional en geles de acrilamida (30% Acrilamide/Bis Solution, Bio-Rad) que contenían dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%. La acrilamida es un compuesto con capacidad para formar redes que, en función de su concentración, forma poros de tamaño variable, a través de los cuales migran las proteínas. Los geles de poliacrilamida se forman por

copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la N,N,NN'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y catalizada por el persulfato amónico (PSA).

Las muestras de espermatozoides (50 µg), los controles positivos, tejido renal de origen humano (30 µg), se diluyeron en tampón RIPA y finalmente se añadió un tampón de carga que contenía β-mercaptoetanol (5%), que dotaba a las muestras unas condiciones reductoras. Después se calentaron a 96°C durante 5 minutos para que se produjese la desnaturalización. Siendo necesaria esta desnaturalización, ya que en condiciones reductoras, los enlaces disulfuro intra- e intercatenarios de las proteínas son disociados y las subunidades proteicas se separan en cadenas polipeptídicas, favoreciendo su unión con el SDS y su posterior y exclusiva separación en función del peso molecular. El SDS es un detergente aniónico que se mezcla con las proteínas, de manera que se forman complejos desnaturalizados cargados negativamente.

Una vez preparado, las distintas muestras junto con los marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad) fueron cargados en los geles de acrilamida. La electroforesis SDS-PAGE emplea dos geles que tienen los mismos componentes pero diferente proporción de cada uno de ellos, creando así un sistema electroforético discontinuo de distinta porosidad y pH. Por un lado, el gel concentrador, que es donde están las calles en las que se cargan las proteínas y cuya función es compactarlas al principio del siguiente gel. Por otro lado, el gel separador, que es por donde migran las proteínas separándose en función de su tamaño (peso molecular). Estos geles tienen un grosor de 75 µm, que se corresponde con el espacio existente en el molde empleado para su realización, y que está constituido por dos cristales. El gel concentrador siempre tiene una proporción del 4% de acrilamida, mientras que el gel separador tiene una concentración de acrilamida variable, siendo menor el tamaño de poro cuanto mayor sea el porcentaje de acrilamida usado. Para la realización de estos western blot, teniendo en cuenta el tamaño de las proteínas que se querían detectar, se usaron geles con un porcentaje de acrilamida del 10% (vol/vol). Las proteínas se migraron a 100V por el gel concentrador y a 200V a través del gel separador hasta su correcta separación para su posterior transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

#### 1.2.4. Transferencia

La transferencia se basa en aplicar un campo eléctrico que hace que las proteínas migren del polo negativo (ánodo) al polo positivo (cátodo), lo que permite transferir las proteínas del gel a la membrana.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (PVDF Transfer Membrane, Amersham Hybond™-P) mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel y a la membrana. Las membranas de PVDF tienen gran capacidad de unión a proteínas pero son hidrofóbicas, por lo que se hace necesario tratarlas con metanol antes de sumergirlas en soluciones acuosas para que se vuelva hidrofílicas.

Para la transferencia, de las proteínas, se realizó un sándwich de transferencia que contenía en este orden: esponja, papel *whatman* (x3), gel, membrana de transferencia (PVDF), papel *whatman* (x3) y esponja. Todo previamente hidratado con tampón de transferencia, excepto la membrana de PVDF, que se activó con metanol antes de su hidratación en el tampón de transferencia.

Este sándwich se colocó en un casete de transferencia que se introdujo en la cubeta, asegurándose que el gel se encontrase en el lado negativo, ya que las proteínas, con carga negativa, se mueven hacia el lado positivo. Es decir, a la membrana. Se cubrió todo con tampón de transferencia y se mantuvo a 100V durante 1 hora. Durante este tiempo, se mantuvo todo el sistema refrigerado y se hizo recircular el tampón, ya que este proceso provoca un fuerte calentamiento de la solución, lo cual tiene un efecto negativo sobre las proteínas.

#### 1.2.5. Inmunodetección

Finalmente, tras la transferencia de las proteínas a las membranas de PVDF, se llevó a cabo la identificación de las proteínas de interés mediante el uso de anticuerpos específicos. Las membranas se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo, compuesta por Blotto con leche desnatada en polvo al 5%, para obstruir los posibles puntos de unión inespecíficos de los anticuerpos a la membrana. A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios específicos del sistema RAS (Tabla 12).

Anticuerpo	Hospedador	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti receptor de angiotensina II tipo 2	Conejo	1:750	Abcam	ab78747
	Conejo	1:500	Abcam	ab19134
Anti receptor de renina	Conejo	1:800	Santa Cruz Biotech.	sc-67390
Anti- IgG de conejo (HRP)	Cabra	1:3.000	Abcam	ab6112

**Tabla 12.** Tabla en la que se muestran las diluciones de los distintos anticuerpos usados para el inmunoblotting.

Al día siguiente las membranas se lavaron con buffer Blotto (3x5 minutos) y se incubaron, durante 1 hora, con el anticuerpo secundario (IgG) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, la detección de las bandas se realizó usando un sistema amplificador de la quimioluminiscencia, sistema ECL. El sistema ECL se basa en la producción de quimioluminiscencia gracias a una reacción catalizada por la enzima peróxidasa sobre el peróxido de hidrógeno. El revelado se llevo a cabo usando un trans-iluminador Chemidoc™ XRS y el software informático Quantity One (Bio-Rad).

### 1.3. Citometría de flujo

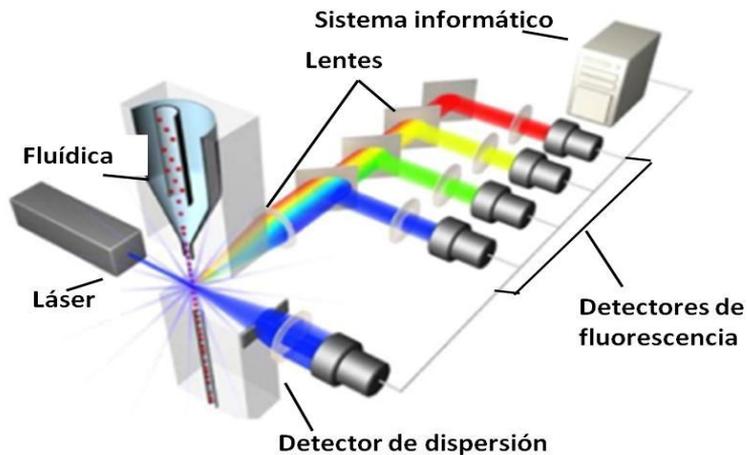
La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis de una población celular de un modo rápido, sensible y específico. Lo cual se consigue mediante el estudio de determinadas características físicas y químicas de las células en suspensión que producen una señal al interferir con una fuente de luz. Esto permite analizar múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad (por dispersión de la luz visible) y de cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo (dispersión de haz de luz de una longitud de onda determinada).

Una característica importante que representa una ventaja de esta técnica, es la posibilidad de medir de forma simultánea, tantos parámetros como anticuerpos se dispongan para ello. Para ello, dichos anticuerpos han de estar conjugados con fluorocromos de diferentes longitudes de onda. Los fluorocromos son moléculas que al ser excitadas con la energía de una determinada longitud de onda, son

capaces de emitir energía de una longitud de onda mayor. Estas características son las que permiten el análisis multiparamétrico.

Esta técnica se basa en que las células, al pasar de forma ordenada, de una en una, por delante de un haz luminoso producen su dispersión, lo que es detectado por un sensor. La información producida puede diferenciarse en dos, una la generada por la dispersión de la luz y otra en la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula al ser excitados por el haz luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por un software informático (Figura 12).

Una vez que las células de interés han sido distinguidas de los otros tipos celulares, en función de la dispersión de la luz, se puede usar la inmunofluorescencia para determinar la presencia/ausencia y la proporción o número de células que poseen un determinado marcador.



**Figura 12.** Esquema que muestra los componentes de un citómetro de flujo y su disposición.

### 1.3.1. Preparación de las muestras

Una vez finalizados los procedimientos de fecundación *in vitro*, las muestras seminales se fijaron con paraformaldehído (PAF) al 4% y se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis.

### 1.3.2. Citometría semi-cuantitativa

La semi-cuantificación de los niveles proteicos del AT2R y del PRR, se realizó midiendo la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo, empleando anticuerpos específicos para cada receptor.

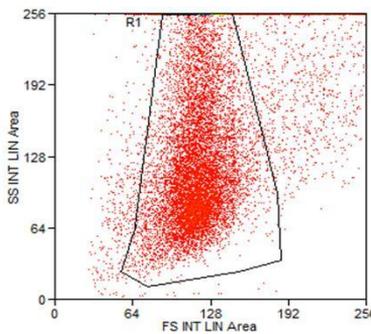
La muestra se dividió en fracciones alícuotas que se centrifugaron a 3.500g durante 6 minutos, para eliminar el medio de fijación en el que permanecían los espermatozoides y se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 1x. Seguido, las muestras se permeabilizaron con PBS-Tritón® X-100 0,5% durante 10 minutos en continua agitación y una vez pasado este tiempo se volvieron a lavar con PBS 1x. Una vez eliminada la solución de permeabilización, se procedió al bloqueo, con el fin de evitar posteriores uniones inespecíficas de los anticuerpos. Éste se llevó a cabo durante 30 minutos con suero bovino fetal (SBF) al 10% en PBS 1x. Transcurrido este tiempo se eliminó el SBF y se añadieron las diluciones de anticuerpos diseñados para reconocer los distintos receptores y enzimas del RAS estudiados (Tabla 13). Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se eliminó la dilución de anticuerpo primario mediante centrifugación a 3.500g durante 6 minutos, se lavaron las muestras con PBS 1x y se incubaron, durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad, con un anticuerpo secundario marcado con una molécula fluorescente (Tabla 13). Una vez pasado este tiempo, se tiñeron los núcleos con Hoechst 33258 (Invitrogen) a una concentración de 5 µg/mL durante dos minutos, pasados los cuales, las fracciones de la muestra se resuspendieron en PBS 1x.

Con anterioridad a los análisis se determinó la especificidad tanto de los anticuerpos primarios como de los secundarios. La especificidad de los anticuerpos primarios se determinó mediante la adición de Inmunoglobulinas inespecíficas (Negative Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal)) en concentraciones idénticas a las empleadas con los anticuerpos primarios. Mientras que la especificidad del anticuerpo secundario se realizó omitiendo el anticuerpo primario antes de la adición del anticuerpo secundario.

Anticuerpo	Hospedador	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti receptor de angiotensina II tipo 2	Conejo	1:250	Abcam	ab19134
Anti receptor de renina	Conejo	1:250	Santa Cruz Biotech.	sc-67390
Anti-ACE humano conjugado con PE	Ratón	1:200	BioLegend	344204
Anti-CD13 humano conjugado con PE	Ratón	1:200	BD Pharmingen™	555394
IgG1, k Isotipo Control conjugado con PE	Ratón	-	BioLegend	400112
Anti- IgG (H+L) de conejo conjugado con Alexa Fluor® 488	Cabra	1:2000	Invitrogen	A11008

**Tabla 13.** Tabla en la que se muestran las diluciones de los distintos anticuerpos usados para la citometría de flujo.

Los datos de fluorescencia se extrajeron del análisis de al menos 10.000 eventos obtenidos en el citómetro de flujo (Gallios, Becton Dickinson). La fluorescencia azul emitida por el Hoechst 33258 y la fluorescencia verde emitida por el anticuerpo secundario unido a Alexa Fluor® 488 se recogieron por los sensores FL9 y FL1 respectivamente. Se realizó una primera selección de los eventos de tamaño y complejidad correspondientes a la población de espermatozoides (Figura 13). Se eliminaban de esta forma, en los siguientes gráficos las células no espermáticas. Con el fin de eliminar la autofluorescencia emitida por los espermatozoides, se eliminó el ruido de fondo (señal de fluorescencia) de los eventos positivos al Hoechst 33258 usando como referencia los controles de cada muestra. Los gráficos de fluorescencia se analizaron mediante el software Summit v4.3. Los resultados obtenidos eran el porcentaje de espermatozoides que presentaban el marcador objeto de estudio.



**Figura 13.** Imagen de citometría de flujo de las poblaciones espermáticas en base a su tamaño y complejidad que muestra una forma característica de llama.

### 1.4. Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es una técnica que permite determinar de forma directa la localización en las células de las proteínas. Para ello, se usan anticuerpos conjugados con fluorocromos. Como ya se ha comentado anteriormente, los fluorocromos son moléculas que al ser excitadas con una energía de una determinada longitud de onda, son capaces de emitir energía de otra longitud de onda mayor. La localización se realiza a través de un microscopio de fluorescencia o confocal, capaz de recoger específicamente la luz emitida por el anticuerpo conjugado con el fluorocromo. La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia indirecta. Este método requirió del uso de dos anticuerpos de forma consecutiva, un anticuerpo primario que se une a la proteína objeto de estudio y un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo, que detectó de forma específica el anticuerpo primario.

Los espermatozoides, previamente fijados en paraformaldehído al 2% (vol/vol), se lavaron con PBS 1x y se resuspendieron en PBS 1x. Se extendieron en unos cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina y se dejaron secar. Se permeabilizaron con Tritón® X-100 al 1% en PBS 1x durante 10 minutos en agitación. Se retiró el Tritón® X-100 y se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x. Posteriormente, se bloquearon las muestras con SBF 10% (vol/vol) en PBS 1x durante 30 minutos. A continuación, se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 14) en PBS-SBF 5%. Se eliminó el anticuerpo primario de las muestras, se hicieron 3 lavados de 5 minutos

con PBS 1x y éstas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG Alexa Fluor® 488 en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se hicieron otros tres lavados con PBS 1x durante 5 minutos, se añadió Hoechst 33258 (Invitrogen) a una concentración de 5 µg/mL y se dejó incubando durante dos minutos para que se intercalase en los núcleos, marcándolos.

Anticuerpo	Hospedador	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti receptor de angiotensina II tipo 2	Conejo	1:500	Abcam	ab19134
Anti receptor de renina	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotech.	sc-67390
Anti- IgG (H+L) de conejo conjugado con Alexa Fluor® 488	Cabra	1:1000	Invitrogen	A11008

**Tabla 14.** Tabla en la que se muestran las diluciones de los distintos anticuerpos usados para la inmunocitoquímica.

El fluorocromo Alexa Fluor 488 posee una longitud de onda máxima de excitación y absorción de 495nm y 519nm respectivamente. Por lo que las muestras se excitaron con un láser de argón a 488nm y se recogió luz entre 505-520nm. El Hoechst 33258 es un marcador de DNA, permeable a la membrana celular, que fluoresce en azul cuando se une al surco menor de la doble cadena de DNA. Posee una longitud de onda máxima de excitación y absorción de 352nm y 461nm respectivamente, siendo idónea una combinación con Alexa Fluor 488, ya que no se produce solapamiento entre sus espectros de emisión.

El montaje de las muestras se realizó con Fluoromont G (Southern Biotech). Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal (Microscopio confocal de láser, Olympus Fluoview FV 500) que permite solapar imágenes de planos consecutivos de los espermatozoides, permitiendo visualizar de una forma óptima las zonas que emitían fluorescencia, que son las zonas donde había presencia de estos marcadores de interés. Las imágenes se procesaron con el software informático Fluoview v5.0. y el programa de análisis de imágenes Image J.

## Material y Métodos

---

Simultáneamente se realizaron controles negativos de los anticuerpos secundarios siguiendo el mismo procedimiento experimental pero omitiendo la adición de los anticuerpos primarios. Por otra parte, la determinación de la especificidad de los anticuerpos primarios, no se creyó necesaria puesto que análisis previos de citometría de flujo, con diluciones más concentradas de los mismos anticuerpos, demostraron que las uniones inespecíficas que se producían eran mínimas.

## **Objetivo 2: Relación del AT2R, PRR, tACE y APN con los parámetros seminales**

### **2.1. Citometría de flujo**

#### **2.1.1. Preparación de las muestras**

Las muestras se procesaron tal y como se describe el en apartado 1.3.1.

#### **2.1.2. Citometría semi-cuantitativa**

Mediante citometría de flujo semi-cuantitativa (explicado en el apartado 1.3.2.), se determinó el porcentaje de espermatozoides que presentaban el AT2R, el PRR, la tACE y la APN. Posteriormente, los porcentajes de espermatozoides positivos para cada elemento del RAS analizado en los espermatozoides, se relacionaron con las variables del estudio descritas en el apartado 2.2.

#### **2.1.3. Citometría cuantitativa**

Tradicionalmente la citometría de flujo se ha utilizado para determinar la presencia/ausencia de determinados antígenos en la superficie o en el interior de las células de una manera cualitativa o semi-cuantitativa. Las técnicas de citometría cuantitativa permiten conocer el número de antígenos por célula. Uno de estos métodos se basa en el uso de unas esferas conjugadas con moléculas de ficoeritrina (PE). Éste método es el QuantiBRITE PE\* (Becton Dickinson), que también permite una estandarización cuantitativa en términos de anticuerpos unidos por célula (ABC). Además, esta técnica permite la estandarización de las medidas adquiridas en distintos citómetros y también las adquiridas en el mismo instrumento evitando la variación que se puede producir a lo largo del tiempo. Cada tubo de QuantiBRITE PE\* contiene un liofilizado con cuatro poblaciones diferentes de esferas. Cada una de las poblaciones de esferas está conjugada con un número pre-establecido y conocido de moléculas de ficoeritrina (PE). De forma que usando un anticuerpo monoclonal unido a PE con un ratio anticuerpo-molécula de PE conocida, en nuestro caso (1:1), se puede estimar, de forma directa, el número de antígenos por célula (Figura 14). Debido a la necesidad de utilizar anticuerpos monoclonales en

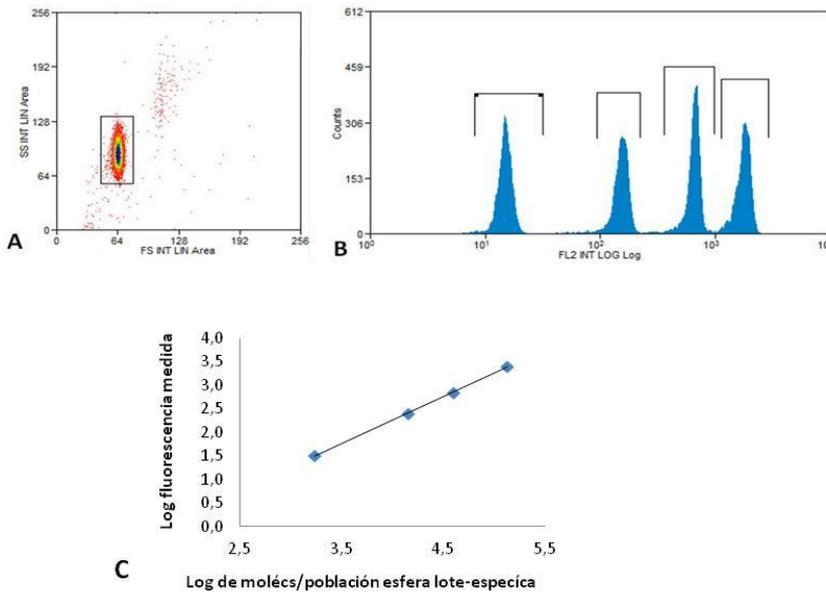
dicha técnica, sólo se puso a realizar la cuantificación proteica de la tACE y la APN mediante citometría cuantitativa.

Las muestras se dividieron en fracciones alícuotas que se centrifugaron a 3.500g durante 6 minutos, con el objetivo de eliminar el medio de fijación en el que permanecían los espermatozoides, y se lavaron con PBS 1x. A continuación se añadieron diluciones de los anticuerpos monoclonales primarios específicos, así como un isotipo control usado como control negativo. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se eliminó la dilución de anticuerpo primario mediante una centrifugación a 3.500g durante 6 minutos, se lavaron las muestras con PBS 1x y se tiñeron los núcleos con Hoechst 33258 (Invitrogen) a una concentración de 5 µg/mL, durante un par de minutos. Pasado este tiempo, las muestras se resuspendieron en PBS 1x. Antes del análisis las muestras en el citómetro de flujo, se realizó una recta patrón utilizando el Kit QuantiBRITE PE\* siguiendo las instrucciones del fabricante, como se detalla más adelante.

Los datos de fluorescencia se obtuvieron del análisis de, al menos, 10.000 eventos obtenidos en el citómetro de flujo (Gallios, Becton Dickinson). La fluorescencia azul emitida por el Hoechst 33258 y la fluorescencia roja emitida por las moléculas de ficoeritrina, a las que estaban unidos los anticuerpos, se recogieron por los sensores FL9 y FL2 respectivamente. Se realizó una primera selección de los eventos detectados con un tamaño y complejidad correspondientes a la población de espermatozoides, eliminando de esta forma en los siguientes gráficos a las células no espermáticas. Con el fin de eliminar la autofluorescencia emitida por los espermatozoides, se eliminó el ruido de fondo (señal de fluorescencia) de los eventos positivos al Hoechst 33258 tomando como referencia los controles de cada muestra. Los gráficos de fluorescencia se analizaron mediante el software Summit v4.3.

La cuantificación proteica se realizó mediante la determinación del ABC de las muestras de espermatozoides y su posterior extrapolación a una recta patrón con las medias de intensidad de fluorescencia de las cuatro poblaciones de esferas. Para la realización de la recta patrón, se seleccionó el conjunto de las poblaciones de esferas (Figura 14A) en la gráfica que mostraba el tamaño y la complejidad. Posteriormente, se analizaron las poblaciones de esferas en un histograma que mostraba la intensidad de fluorescencia roja recogida por el sensor FL2 (Figura 14B). Se anotó la media de fluorescencia de cada población y se calcularon los

logaritmos en base 10 de los valores lote-específicos de las moléculas de PE de cada población y de los valores de las medias de fluorescencia de las poblaciones de células. Estos valores se representaron en una gráfica de regresión lineal y se determinó la ecuación de la recta (Figura 14C). Para la determinación del valor ABC de cada muestra, se sustituyó la media de fluorescencia recogida por el sensor FL2 y se calculó el antilogaritmo del valor obtenido tanto de las esferas patrón, como de las muestras espermáticas.



**Figura 14.** **A)** Diagrama de dispersión del conjunto de las poblaciones de esferas en función de su tamaño y complejidad. **B)** Histogramas de las intensidades de fluorescencia de las distintas poblaciones de esferas. **C)** recta obtenida de los logaritmos de las intensidades de fluorescencia de las poblaciones de esferas en función del número de moléculas de ficoeritrina que tienen unidas.

De forma simultánea, se determinó para cada muestra espermática el porcentaje de espermatozoides positivos para cada una de las enzimas del RAS analizadas.

Finalmente, se relacionó el valor de ABC y el porcentaje de espermatozoides positivos obtenidos de cada muestra, con cada una de las variables descritas en el apartado 2.3.

### 2.2. Variables de estudio

Se realizaron dos tipos de aproximaciones estadísticas: 1) análisis de correlaciones, y 2) búsqueda de diferencias entre los distintos grupos de muestras.

En el primer tipo de análisis se correlacionó el porcentaje de espermatozoides positivos para cada elemento del RAS analizado y los valores medios de moléculas de enzima por espermatozoide con:

- **Volumen de las muestras de semen en fresco y tras ser procesadas:** se analizó el volumen seminal de las muestras en fresco y tras ser procesadas.
- **Concentración de las muestras de semen en fresco y tras ser procesadas:** se analizó la concentración espermática de las muestras en fresco y tras ser procesadas.
- **Movilidad espermática de las muestras de semen en fresco y tras ser procesadas:** se analizaron los porcentajes de los distintos tipos de movilidad de las muestras en fresco y tras ser procesadas.

En el segundo tipo de análisis se compararon diferentes grupos de muestras para la búsqueda de diferencias el porcentaje de espermatozoides positivos para cada elemento del RAS analizado y los valores medios de moléculas de enzima por espermatozoide con:

- **Etiologías de las muestras seminales:** se compararon los valores obtenidos en cada una de las etiologías seminales en las que se habían clasificado las muestras de eyaculado: normozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia y oligozoospermia (OMS, 2010).

## **Objetivo 3: Relación del AT2R, PRR, tACE y APN con los parámetros embrionarios**

### **3.1. Donación de oocitos**

La donación de oocitos, al igual que otras donaciones (sangre, médula ósea, semen, etc.) es un acto voluntario, solidario y altruista que permite ayudar, a parejas o a otras mujeres, a cumplir sus deseos genésicos. Es completamente anónima, ya que la ley española prohíbe expresamente revelar ninguno de estos datos (Ley 14/2006, 2006). De forma que ni las donantes pueden conocer a los niños nacidos mediante estas técnicas, ni éstos pueden conocer la identidad de las donantes.

#### **3.1.1. Selección de las donantes**

Las donantes deben cumplir una serie de características. Deben tener una edad comprendida entre los 18-34 años; gozar de un buen estado psicofísico y carecer de antecedentes personales o familiares de enfermedades hereditarias (cariotipo normal), esquizofrenia, depresión, epilepsia, alcoholismo, etc. Además, no deben presentar ninguna enfermedad de transmisión sexual, lo que se comprueba mediante la obtención de serologías negativas, previas a la estimulación, para distintas enfermedades por ejemplo sífilis, toxoplasma, rubéola, gonorrea, Chlamydia, hepatitis B, hepatitis C y VIH.

Todas las donantes pertenecientes a este estudio mostraban ciclos menstruales de 23-24 días de duración, un índice de masa corporal (IMC) entre 18-28 Kg/m<sup>2</sup>, ausencia de tratamiento endocrino (incluyendo la administración de gonadotropinas y/o algún tipo de anticonceptivo oral en los 3 meses previos al estudio), útero y ovarios ecográficamente normales y un recuento de folículos antrales de al menos 6 folículos por ovario el primer día de la estimulación con gonadotropinas después de la desensibilización hipofisaria con el análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

Las donantes de oocitos debían firmar un consentimiento informado que se les entregaba en el centro y en el que figuraban los fines y consecuencias del acto, así como los procedimientos y/o estudios a los que iba a ser sometida.

En lo que concernía a la asignación de una donante a una receptora, siempre se tendía a conseguir la máxima similitud fenotípica e inmunológica (grupo sanguíneo y Rh) con la pareja receptora y su entorno familiar.

### 3.1.2. Estimulación ovárica de las donantes

Las donantes se sometieron a una estimulación ovárica controlada para provocar el desarrollo del mayor número de folículos posibles de forma que se obtuviese un número de oocitos adecuados para las técnicas de FIV o ICSI.

Se utilizaron dos protocolos con agonistas de la GnRH, aplicándose uno u otro en función de las características de cada receptora:

- El **protocolo de estimulación largo** constó de una primera parte en la que se provocó una supresión hipofisaria con agonistas de la GnRH en protocolo largo (la administración comenzaba el día 21 del ciclo anterior). Y una segunda parte en la que se administró FSH recombinante (FSHr) en unas dosis ajustadas a la respuesta folicular, con el objetivo de obtener una respuesta por parte de los ovarios y provocar el reclutamiento y desarrollo de los folículos. En los casos en los que fue necesario, se suplementó la estimulación con hormona luteinizante recombinante (LHr) y/o hMG (LH+FSH).
- El **protocolo de estimulación corto** consistió en la administración de un análogo de la GnRH durante los primeros días del ciclo menstrual, así como FSHr, ajustando las dosis a la respuesta folicular. En los casos en los que fue necesario, se suplementó la estimulación con LHr y/o hMG.

En ambos casos el seguimiento del crecimiento folicular se realizó mediante controles ecográficos periódicos, así como con la determinación del estradiol sérico, para optimizar las dosis hormonales y evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). Cuando ecográficamente se observaron folículos con un diámetro de 17-18 mm, se indujo la ovulación mediante la administración subcutánea de gonadotropina coriónica humana recombinante (hCGr). La punción ovárica se programó 36 horas después de la inducción de la ovulación.

### 3.1.3. Preparación endometrial de las receptoras

El objetivo del tratamiento sustitutivo en las receptoras de oocitos es preparar el endometrio para recibir al embrión, permitir la implantación, y mantener los estadios iniciales de la gestación, hasta que la placenta asuma su propia autonomía hacia los 50-60 días de gestación. Para ello, se les administraron estrógenos (estradiol), con el objetivo de conseguir la proliferación endometrial. Ésta fue monitorizada con mediciones rutinarias del grosor del endometrio. Posteriormente, desde el día de la captación de los oocitos (día de la punción), se comenzó con la administración de gestágenos (progesterona), para producir la transformación secretora del endometrio. Los gestágenos se mantuvieron hasta el día de la determinación sérica de hCG, y durante los tres meses posteriores cuando la prueba de embarazo resultó positiva.

### 3.2. Punción ovárica y recuperación de los oocitos

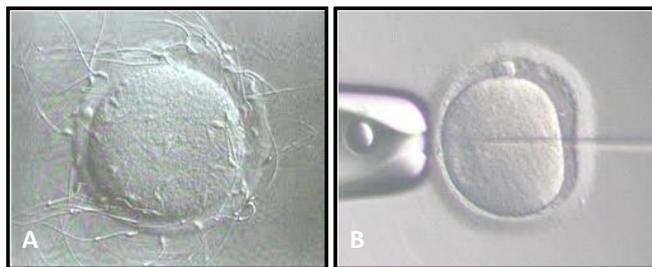
Entre las 34-36 horas posteriores, se llevó a cabo la extracción de los oocitos de los folículos desarrollados. Esta extracción se realizó bajo sedación de la paciente, mediante aspiración folicular guiada por ecografía transvaginal.

Tras el lavado vaginal con suero fisiológico, se puncionaron los folículos uno a uno aspirando el líquido folicular y depositándolo en tubos estériles precalentados a 37°C. Estos tubos se llevaban inmediatamente al laboratorio de fecundación *in vitro* (FIV), donde se recuperaban los complejos cúmulo-corona-oocito del líquido folicular. Posteriormente, se eliminaba con la ayuda de dos jeringas la mayor parte de las células de la granulosa que rodeaban a los oocitos (decumulación) y se guardaron en el incubador a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, durante aproximadamente 4 horas, hasta su uso.

Los oocitos que se encontraban vitrificados, se sometieron a un proceso de desvitrificación 2 horas antes de ser microinyectados. Estos oocitos sólo son fecundados mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), ya que tras el proceso de criopreservación, se inducen alteraciones en la estructura oocitaria que dificulta o imposibilita la penetración espermática a través de las cubiertas oocitarias, haciéndose por tanto necesaria su microinyección.

### 3.3. Técnicas de fecundación *in vitro*

La fecundación *in vitro* de los oocitos se puede realizar mediante dos técnicas, la fecundación *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La FIV consiste en la coincubación de un oocito con un pool de espermatozoides, mientras que la ICSI consiste en la microinyección de un único espermatozoide dentro del oocito (Figura 15).



**Figura 15.** Imágenes de las técnicas de fecundación *in vitro*. **A)** fecundación *in vitro* y **B)** inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

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

La FIV, como ya se ha explicado, consiste en coincubar los oocitos con un volumen de muestra de espermatozoides procesados (considerados como espermatozoides capacitados). De forma que uno de los espermatozoides de la muestra fecunda al oocito. Esta técnica se realizó usando oocitos a los que no se les había eliminado el complejo cúmulo oóforo-oocito, o lo que es lo mismo, que no habían sido decumulados. Esto imposibilitó la observación de su estadio de maduración, de forma que hasta el día siguiente a su fecundación no se pudo evaluar si los oocitos habían alcanzado la madurez.

El procedimiento de FIV se llevó a cabo incubando los oocitos en microgotas individuales, que contenían una dilución de espermatozoides ajustada a una concentración, siendo esta concentración en torno a 60.000 espermatozoides por mililitro (Figura 15A). Una vez depositados los oocitos en las gotas con el medio, se incubaron en oscuridad a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, hasta el momento de valorar la fecundación.

### 3.3.2. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

#### 3.3.2.1. Preparación de los oocitos para la ICSI

A las 2 horas de haber obtenido los oocitos, se procedió a su decumulación, con el objetivo de valorar su estado de maduración y permitir una microinyección más precisa. La decumulación se realizó mediante métodos enzimáticos y mecánicos. El método enzimático consistió en la inmersión de los oocitos en una solución 1:1 con hialuronidasa durante 20-30 segundos. Los métodos mecánicos consistieron en hacer pasar a los oocitos a través de pipetas de diámetros decrecientes. Tras la eliminación de todas las células que rodeaban a los oocitos, se observó el estadio madurativo en el que se encontraban, siendo únicamente seleccionados los oocitos en metafase II (MII), descartándose los inmaduros (atrésico, vesícula germinal y metafase I). Una vez decumulados se volvieron a guardar en el incubador a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, durante aproximadamente 2 horas más.

#### 3.3.2.2. Metodología de la ICSI

Para el proceso de microinyección, se empleó un microscopio invertido con pletina calefactada y un equipo de micromanipulación. Se usaron dos tipos de pipetas, una pipeta de sujeción o holding, con la que se mantuvo fijado al oocito, y una pipeta de microinyección con la que se aislaron y microinyectaron los espermatozoides en el oocito (Figura 15B). La sujeción de los oocitos y la microinyección de los espermatozoides se realizaron teniendo en cuenta la posición del corpúsculo polar para evitar posibles alteraciones del huso meiótico. Una vez microinyectados los oocitos, se traspasaron a una placa de incubación, y se depositaron cada uno en una gota con medio de cultivo de embriones. Estas placas se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, hasta el momento de la valoración de la fecundación.

## 3.4. Análisis de la fecundación y evaluación embrionaria

### 3.4.1. Evaluación de la fecundación

La ***evaluación de la fecundación*** de los oocitos se llevó a cabo entre las 16 y las 22 horas tras la inseminación-microinyección, mediante su observación en un microscopio invertido con el objetivo de 40x. Se consideraron como fecundados, únicamente los embriones que presentaban 2 corpúsculos polares (CP) y 2

pronúcleos (PN) (Figura 16). La valoración de los pronúcleos se considera como uno de los puntos más importantes, ya que es la prueba que indica que el cigoto es diploide ( $2n$ ), fruto de la unión de los genomas parentales. Cualquier alteración en el número de CP o PN fue considerada como una anomalía en el proceso de fecundación. La no observación de dos CP y dos PN sugiere un fallo de fecundación. Teniendo en cuenta el número de oocitos microinyectados o fecundados y el número de cigotos obtenidos se calcularon las tasas de fecundación.



**Figura 16.** Imagen de un oocito correctamente fecundado, en el que se pueden observar en posición central dos pronúcleos (PN) con los precursores nucleolares y dos corpúsculos polares (CP) en el espacio perivitelino.

### 3.4.2. Evaluación de la calidad embrionaria de embriones tempranos

La **calidad embrionaria** se evaluó según la morfología embrionaria en día 2 (D+2: 44-47 horas post-inseminación) y en día 3 (D+3: 67-71 horas post-inseminación), teniendo en cuenta los criterios marcados en la 2ª edición de los criterios de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) (ASEBIR, 2008). Esta clasificación morfocinética establece cuatro categorías embrionarias en función del potencial de implantatorio esperado, A, B, C y D. La asignación de un embrión a una categoría depende de la combinación de las valoraciones de distintos parámetros morfocinéticos (ASEBIR, 2008) (ANEXO I).

Debido a que los parámetros de número, porcentaje de fragmentación y simetría de los blastómeros son considerados como los más relevantes a la hora de asignar la calidad, también fueron analizados de forma individual en este estudio.

#### **3.4.2.1. Número de células**

Este parámetro consiste en contabilizar el número de células o blastómeros que componen el embrión. Siendo tanto el número de células en D+2, como el ritmo de división de D+2 a D+3, uno de los parámetros más importantes en la asignación de la calidad embrionaria.

En cuanto al número de células, los embriones compuestos por 4 células en D+2 son los que presentan una máxima capacidad de implantación. Mientras que en D+3 de desarrollo, los embriones compuestos por 7-8 células son los que presentan la mayor capacidad de implantación (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015). Teniendo en cuenta esto, se quiso comparar los distintos componentes del RAS estudiados en los espermatozoides, en relación al número de células por las que estaban formados los embriones tempranos (D+2 y D+3). Para ello se realizaron distintas agrupaciones según el número de blastómeros observados en cada uno de los embriones. Así, en D+2 estas agrupaciones contenían los embriones formados por: 1) < de 4 células; 2) 4 células y 3) > 4 células. Mientras que en D+3 estas distintas agrupaciones contenían los embriones formados por: 1) < de 7 células; 2) 7 ó 8 células y 3) > 8 células.

#### **3.4.2.2. Porcentaje de fragmentación celular**

La presencia de fragmentación celular es común en los embriones humanos y no siempre se correlaciona con una baja tasa de implantación. Este parámetro se evalúa como porcentaje de espacio embrionario ocupado por fragmentos celulares resultantes de la división celular.

#### **3.4.2.3. Igualdad en el tamaño o simetría de los blastómeros**

La simetría o igualdad del tamaño de los blastómeros se evalúa mediante la observación y comparación del volumen de todas las células del embrión. Los embriones se agrupan en cuatro categorías según la simetría que presentaban sus blastómeros (Tabla 15).

Categoría de clasificación de la simetría embrionaria	
Simetría	Descripción
1	embriones cuyos blastómeros tenían un tamaño similar cuando presentaban un número par de células y una relativa asimetría cuando estaban compuestos por un número impar de células
2	embriones cuyos blastómeros tenían ligera asimetría
3	embriones cuyos blastómeros tenían bastante asimetría (diferencias hasta del 20% del volumen)
4	embriones en los que existía un blastómero dominante que ocupaba una tercera parte o más del volumen del embrión ó una diferencia mayor del 25% entre el blastómero más grande y el más pequeño

**Tabla 15.** Categorías de clasificación de la simetría embrionaria según los criterios de ASEBIR (ASEBIR, 2008).

### 3.4.3. Evaluación de los blastocistos

ASEBIR también establece un sistema de gradación de los blastocistos, o embriones en fases avanzadas del cultivo *in vitro*, en función del potencial implantatorio esperado. Aunque, debido a la complejidad del sistema de valoración de los blastocistos, en la realización de este trabajo, sólo se tuvieron en cuenta los diferentes estadios de desarrollo en los que se encontraban los embriones en los días 5 y 6 de desarrollo (Tabla 16). Además, también se consideraron los embriones no viables, bien porque cuyo desarrollo se había bloqueado o porque habían degenerado, y los embriones con un desarrollo más lento que estaban en fase de mórula compacta.

La evaluación de los blastocistos según su evolución se realiza mediante la observación de distintas características morfológicas, las cuales están detalladas en la tabla 16.

Estadios de evolución de los blastocistos	
Simetría	Descripción
<b>Blastocisto temprano (BT)</b>	comienza a formarse la cavidad (blastocele) en el interior del embrión y empieza la diferenciación celular
<b>Blastocisto en expansión o cavitado (BC)</b>	el blastocele ocupa más del 50% del volumen del embrión
<b>Blastocisto expandido (BE)</b>	el embrión se expande, aumentando su volumen y disminuyendo el grosor de la zona pelúcida. Se observa el blastocele, rodeado por el trofoectodermo, y la MCI.
<b>Blastocisto en eclosión o en fase de hatching (BHi)</b>	el blastocisto comienza a salir de la zona pelúcida

**Tabla 16.** Categorías de clasificación de la simetría embrionaria según los criterios de ASEBIR (ASEBIR, 2008).

### 3.5. Variables de estudio

Se realizaron dos tipos de aproximaciones estadísticas: 1) análisis de correlaciones, y 2) comparación de diferentes grupos de muestras para determinar si existían diferencias entre ellos.

En el primer tipo de análisis se correlacionó el porcentaje de espermatozoides positivos para cada elemento del RAS analizado y los valores medios de moléculas de enzima por espermatozoide con:

- **Tasa de fecundación:** se correlacionó con el número de oocitos correctamente fecundados en relación a todos los oocitos maduros de cada cohorte embrionaria usados en las distintas TRA.
- **Número de células de los embriones en D+2 y D+3:** se correlacionó el número medio de células de observadas en cada cohorte embrionaria en los días 2 y 3 de desarrollo
- **Porcentaje de fragmentación de los embriones en D+2 y D+3:** se correlacionó con el porcentaje medio de fragmentación observado en cada cohorte embrionaria en los días 2 y 3 de desarrollo.

- **Simetría de los embriones en D+2 y D+3:** se correlacionó con la media de la simetría observada en cada cohorte embrionaria en los días 2 y 3 de desarrollo.

En el segundo tipo de análisis se basaba en la búsqueda de diferencias entre los distintos grupos de muestras y el porcentaje de espermatozoides positivos para cada elemento del RAS analizado y los valores medios de moléculas de enzima por espermatozoide con:

- **Calidad embrionaria en D+2 y D+3:** se compararon las categorías de calidad embrionaria en las que se han clasificado los embriones en los días 2 y 3 de desarrollo.
- **Número de células de los embriones en D+2 y D+3:** se compararon las distintas agrupaciones según el número de blastómeros observadas en los embriones en los días 2 y 3 de desarrollo.
- **Estadio de desarrollo de los blastocistos en D+5 y D+6:** se compararon los blastocistos según su estadio de evolución, en los días 5 y 6 de desarrollo.
- **Viabilidad de los blastocistos en D+5 y D+6:** se compararon únicamente los embriones en estadio de blastocisto en los días 5 y 6, según si habían sido considerados como viables (transferidos y criopreservados) o no viables (NV).
- **Destino final del embrión:** se compararon los embriones que habían sido transferidos, criopreservados y/o descartados (NV).

## **Objetivo 4: Relación del AT2R, PRR, tACE y APN con los resultados de las TRA**

### **4.1. Transferencia embrionaria**

Las transferencias embrionarias se llevaron a cabo, cuando los embriones estaban en estadios tempranos de su desarrollo (D+3), o cuando estos habían alcanzado el estadio de blastocisto (D+5 ó D+6). La elección de transferir en uno u otro momento dependió de: la indicación médica (edad de la paciente, de su historia clínica, etc.), el número de embriones obtenidos y de la calidad de la cohorte embrionaria. En el caso de existir embriones sobrantes, éstos fueron criopreservados (Ley 14/2006, 2006).

La transferencia se llevó a cabo en quirófano bajo unas rigurosas condiciones de asepsia. Los embriones se depositaron vía transvaginal, bajo control ecográfico, en el tercio superior de la cavidad endometrial. Posteriormente, en el laboratorio, se comprobó que la transferencia se había producido correctamente y que el embrión/es no había/n quedado retenido/s en la cánula de transferencia.

### **4.2. Valoración de la gestación**

La valoración inicial de la gestación se realiza mediante la determinación sérica de la  $\beta$ -hCG, a los 12 días de la transferencia embrionaria. Posteriormente, cuando las pruebas de determinación de  $\beta$ -hCG habían resultado positivas, se realizaron ecografías transvaginales, en la sexta o séptima semana de gestación, para la confirmación de la gestación mediante la observación de saco gestacional con latido cardíaco.

### **4.3. Variables de estudio**

Para el estudio de este objetivo, únicamente se realizaron análisis para determinar si existían diferencias entre los distintos grupos de muestras. En estos análisis también se comparó el porcentaje de espermatozoides positivos para cada

elemento del RAS analizado y los valores medios de moléculas de enzima por espermatozoide con:

- **Transferencia:** se compararon los casos en los que había habido transferencia embrionaria, y en los que no.
- **Transferencia día 3 vs días 5 y 6:** se compararon los embriones trasferidos en D+ 3 y en D+5-D+6.
- **Embarazo bioquímico:** se compararon los casos en los que tras la transferencia embrionaria los de resultados de pruebas de determinación sérica de  $\beta$ -hCG había resultado positivas (gestación bioquímica positiva) y las que habían sido negativas (no gestación).
- **Implantación:** se compararon los casos en los que tras la transferencia de embrionaria se observó o no, la presencia de saco gestacional mediante ecografía. Para el análisis de esta variable únicamente se consideraron los casos en los se transfirió un único embrión.
- **Gestación clínica:** se compararon los casos en los que tras la transferencia embrionaria se observó saco gestacional con latido cardiaco (gestación clínica positiva) y las que no (no gestación).

## 5. Análisis estadístico de los datos

El primer paso fue la realización de un análisis estadístico descriptivo de los datos (media, error estándar, mediana, valor mínimo y valor máximo) para ver el comportamiento general de los mismos. Además, estos análisis iniciales, proporcionaban información como una primera aproximación para iniciar el análisis de los datos. El segundo paso fue la determinación del tipo de distribución que seguían los mismos. Esto se realizó mediante el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (cuando el tamaño muestral era superior a 50) o de Shapiro-Wilk (cuando el tamaño muestral fue menor de 50).

Analizada la distribución de los datos, y viendo que no seguía una distribución normal, se realizaron pruebas no paramétricas. Por lo que los test estadísticos empleados para determinar la relación de las variables de estudio con los parámetros analizados fueron, los test de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Asimismo, para el análisis de las correlaciones bivariadas se utilizó el análisis de correlación de Spearman. Se consideró que había diferencias estadísticamente significativas cuando se obtenían valores de  $p$  inferiores a 0,05, y altamente significativas valores de  $p$  inferiores a 0,01.

Para estudiar el valor predictivo del porcentaje de espermatozoides positivos para los receptores o enzimas a estudio, con respecto a la etiología del paciente en base a la muestra seminal analizada se emplearon curvas ROC (receiver operating characteristic). El análisis de la curva ROC proporciona una serie de valores, como el valor del área bajo la curva (AUC), que está comprendido entre 0,5 y 1 y que puede ser interpretado como una medida de la habilidad de clasificación global del modelo, y los valores de sensibilidad y especificidad. Cuando se determina el poder predictivo de un test clínico, un valor de  $AUC > 0,8$  se considera aceptable.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Microsoft Excel y el paquete estadístico IBM SPSS Statistics v.22.



## **IV. RESULTADOS**



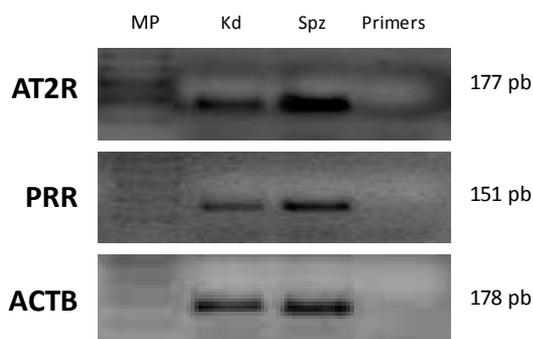
## 1. Expresión y localización del AT2R y del PRR en espermatozoides humanos

### 1.1. Características de las muestras seminales

Para determinar la presencia y localización de los componentes del RAS, el AT2R y el PRR, se usaron 23 muestras de pacientes normozoospermicos. El rango de edad de los pacientes iba de 33 a 49 años, siendo la media de  $40,83 \pm 0,88$  años. Las medias de los parámetros seminales del conjunto de las muestras de eyaculado fueron las siguientes (media  $\pm$  ES): volumen,  $2,8 \pm 0,22$  mL; concentración espermática,  $75,13 \pm 8,26 \times 10^6$  espermatozoides/mL; porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva,  $51,04 \pm 4,24\%$ ; porcentaje de espermatozoides inmóviles,  $41,30 \pm 3,80\%$ . Después del procesamiento de las muestras (mediante swim-up o gradientes de densidad), las características fueron las siguientes: volumen,  $0,77 \pm 0,04$  mL; concentración espermática,  $17,87 \pm 2,44 \times 10^6$  espermatozoides/mL; porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva,  $93,70 \pm 1,28\%$ ; porcentaje de espermatozoides inmóviles,  $5,91 \pm 1,25\%$ .

### 1.2. Expresión génica del AT2R y del PRR

Los mRNA de los genes que codifican para el AT2R y el PRR fueron detectados mediante RT-PCR (Figura 17). Se observó la presencia de los transcritos que codifican para las proteínas del AT2R y del PRR, tanto en espermatozoides humanos (Spz) como en el control positivo en el que se uso RNA extraído de células renales humanas (Kd). Los fragmentos esperados obtenidos fueron de: 177 pb el del AT2R y 151 pb el del PRR (*ATP6AP2*). Para comprobar la ausencia de DNA genómico, se añadieron los primers omitiendo el cDNA en la qRT-PCR, que se uso como control negativo. Finalmente, como control interno, se determinó la expresión de la  $\beta$ -actina (ACTB) en las diferentes muestras analizadas (Figura 17C), observándose una banda esperada de 178 pb.

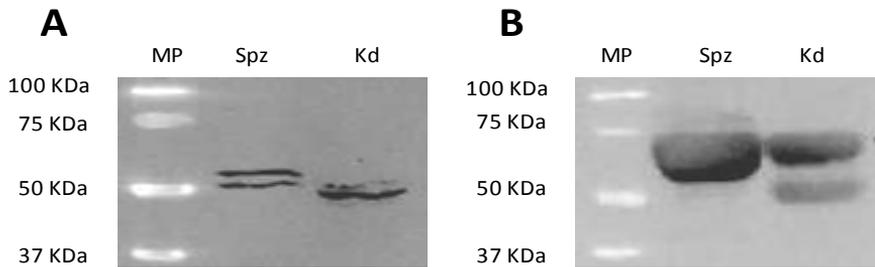


**Figura 17.** Expresión del mRNA del AT2R y PRR en espermatozoides humanos. Amplificaciones de los productos esperados de: AT2R, PRR y ACTB, obtenidos mediante RT-PCR. MP: marcadores de peso molecular; Spz: espermatozoides; Kd: células renales humanas; Primers: control negativo. n=3.

### 1.3. Expresión proteica del AT2R y del PRR

#### 1.3.1. Determinación de la presencia del AT2R y del PRR mediante western blot

La presencia del AT2R y del PRR se detectó mediante inmunoblotting (Figura 18). La existencia del **AT2R** se comprobó tras la observación de dos bandas de 53 y 56 KDa en las muestras de espermatozoides, usando para ello anticuerpos policlonales específicos Anti-receptor de Ang II tipo 2 (Abcam, ab78747), mientras que en el control positivo de tejido renal se observó una única banda de 50 KDa. Estos datos fueron corroborados usando otro anticuerpo policlonal específico (Abcam, ab 19134) (datos no mostrados). De igual manera, la presencia del **PRR** se determinó mediante la observación de una banda de 56 KDa en las muestras espermáticas, mientras que en el control positivo se observaron dos bandas de 50 y 70 kDa, usando el anticuerpo policlonal específico Anti-receptor de renina (H-85) (Santa Cruz Biotech., cs-67390). No se observó inmunoreactividad alguna en ausencia de anticuerpo primario. Como control negativo las membranas se incubaron con anticuerpo secundario omitiendo el anticuerpo primario específico de cada proteína (datos no mostrados).

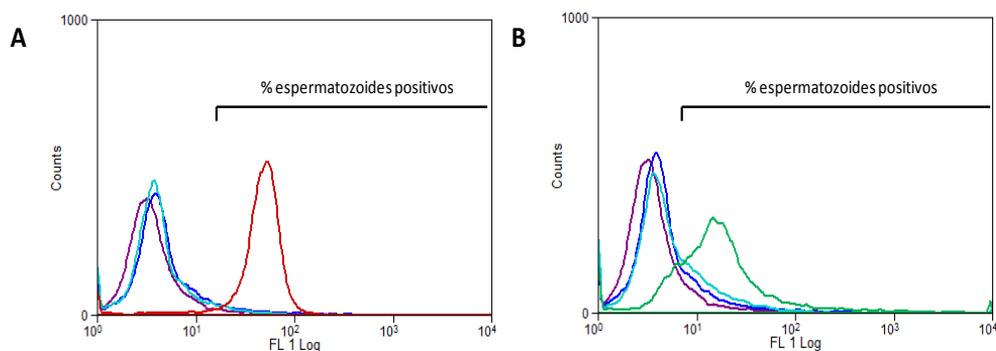


**Figura 18.** Western blot de los AT2R y PRR de espermatozoides humanos. **A)** AT2R, **B)** PRR. MP: marcadores de peso molecular; Spz: espermatozoides; Kd: tejido renal humano. Blots representativos de pacientes normozoospermicos. n=3.

### 1.3.2. Determinación del porcentaje de espermatozoides que expresan el AT2R y el PRR mediante citometría de flujo

Adicionalmente se determinó tanto la presencia del AT2R y del PRR, como el porcentaje de espermatozoides que expresan estos dos receptores, mediante citometría de flujo. Se estableció la presencia de una media de un  $79,44 \pm 1,43\%$  de espermatozoides positivos para el **AT2R** (figura 19A), y de un  $68,99 \pm 1,75\%$  de positivos para el **PRR** (Figura 19B).

La especificidad de los anticuerpos se determinó mediante el análisis de: 1) una muestra a la que no se le había añadido los anticuerpos primario y secundario (blanco); 2) la adición de inmunoglobulinas inespecíficas en concentraciones idénticas a las empleadas con los anticuerpos primarios (control de anticuerpo primario); y 3) omitiendo el anticuerpo primario antes de la adición del anticuerpo secundario (control del anticuerpo secundario) (Figura 19). Estos tres controles mostraron patrones de intensidad de fluorescencia similares, demostrando que la fluorescencia medida en la muestras se debía exclusivamente a la emitida por el anticuerpo específico de unión a los receptores AT2R y PRR.

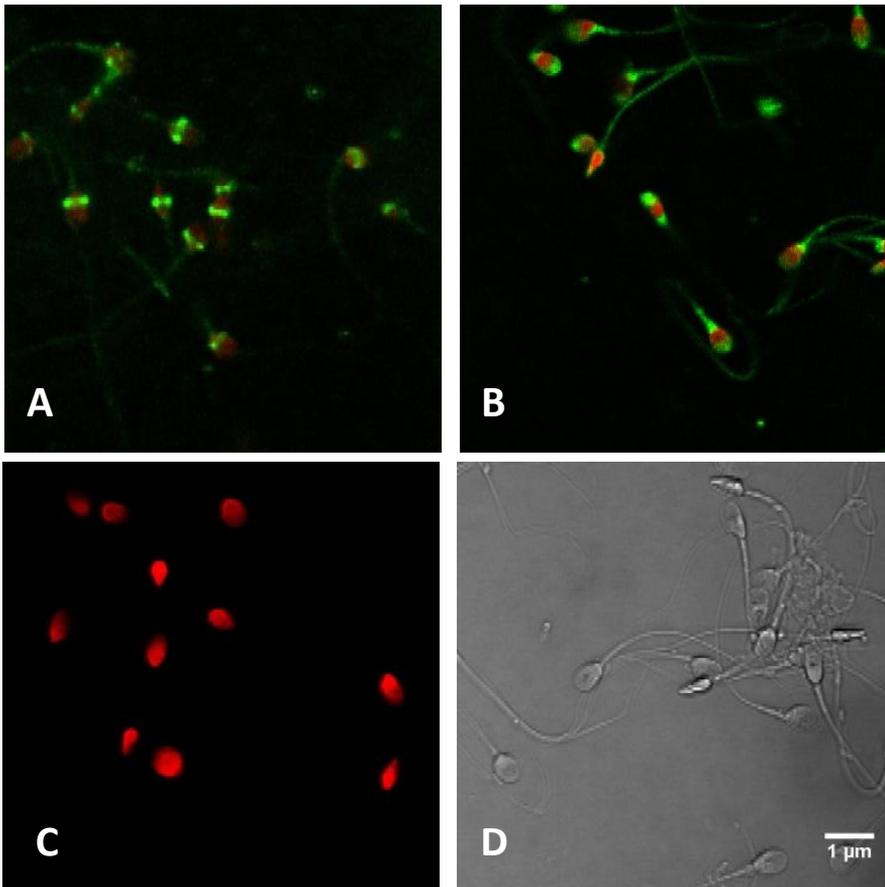


**Figura 19.** Histogramas donde se muestran la intensidad de fluorescencia de una muestra seminal medida por citometría flujo para la determinación del porcentaje de espermatozoides positivos para el (A) AT2R y (B) PRR. En **morado** se muestra la fluorescencia de los espermatozoides usados como blanco, en **azul claro** se muestra la fluorescencia de los espermatozoides tratados como control primario, en **azul oscuro** se muestra la fluorescencia del control secundario, en **rojo** se muestra la fluorescencia de los espermatozoides positivos para el AT2R y en **verde** se muestra la fluorescencia de los espermatozoides positivos para el PRR. Imágenes representativas n=2.

### 1.3.3. Determinación de la localización del AT2R y del PRR mediante inmunocitoquímica

La localización de los distintos receptores del RAS, AT2R y PRR se detectó mediante inmunocitoquímica (Figura 20).

Se detectó inmunoreactividad para el **AT2R**, que se localizaba en la región ecuatorial/postacrosomal de la cabeza de los espermatozoides. Este marcaje se observó en el 80% de los espermatozoides analizados (Figura 20A). Por otro lado, la localización del **PRR** en los espermatozoides humanos se concentra en la parte frontal de la cabeza espermática, sobre la región acrosómica y en la parte posterior de la cabeza, observándose un intenso inmunomarcaje en aproximadamente el 70% de los espermatozoides analizados. Además, se observó un marcaje más leve a lo largo de la cola de los espermatozoides (Figura 20B). Los porcentajes de espermatozoides que presentan inmunoreactividad para cada receptor coinciden con lo anteriormente observado mediante citometría de flujo. En los controles negativos, al omitir el anticuerpo primario específico, no se observaron en las muestras uniones inespecíficas.



**Figura 20.** Inmunocitoquímica de los distintos receptores del RAS estudiados: **A)** AT2R, **B)** PRR, **C)** control secundario, y **D)** imagen de contraste de fases. n= 4. La barra de escala representa 1 µm.

#### 1.4. Resumen de los resultados del primer objetivo

Los distintos experimentos muestran como tanto el AT2R como el PRR se encuentran en los espermatozoides humanos tanto a nivel génico como proteico.

El **AT2R** se encuentra en aproximadamente el 80% de los espermatozoides presentes en una muestra seminal, localizándose principalmente en la región ecuatorial/postacrosomal de la cabeza espermática. Mientras que el **PRR** está presente en el 70% de los espermatozoides analizados, localizándose preferentemente en la parte frontal de la cabeza espermática sobre la región acrosómica y en la parte posterior de la cabeza, y en menor medida a lo largo de la cola.

## 2. Relación del AT2R, el PRR, la tACE y la APN con los parámetros seminales

En este objetivo, se relacionó la expresión de los distintos componentes del RAS analizados (AT2R, PRR, APN y tACE) con los parámetros básicos determinados en un análisis seminal (volumen, concentración y movilidad), con el fin de entender mejor el papel que juegan estos componentes en los espermatozoides humanos. Para analizar estas relaciones, se usaron 173 muestras seminales de varones que acudieron a tratamientos de fecundación *in vitro* y se relacionaron con el porcentaje de espermatozoides positivos para cada uno de los componentes analizados y con la media de moléculas de enzima por espermatozoide. Concretamente se analizaron 97 muestras en el caso del AT2R y del PRR, y 81 muestras para la APN y la tACE.

Como primer paso, se realizó un análisis descriptivo de las características de las muestras seminales analizadas en relación a los receptores de RAS estudiados (Tabla 17) como a las enzimas descritas anteriormente (Tabla18).

En la tabla 17 se puede ver como el **AT2R** está presente en aproximadamente el 81,5% de los espermatozoides, mientras que el **PRR** está presente en el 69% de los espermatozoides analizados. En ambos casos, a pesar de que los valores de porcentajes máximo y mínimo muestran un amplio rango, el error estándar de la media deja ver que estos valores no difieren mucho los unos de los otros.

Análisis descriptivo de los receptores del RAS analizados		
	AT2R	PRR
n	97	97
Media	81,50	69,00
Error estándar	1,04	1,75
Mediana	84,16	72,23
Valor máximo	95,40	94,01
Valor mínimo	48,71	18,29

**Tabla 17.** Análisis descriptivo de los espermatozoides positivos para el AT2R y el PRR analizados en las muestras seminales.

En la tabla 18 se muestran los valores de los parámetros descriptivos de las enzimas del RAS analizadas en esta tesis. En el caso de la **tACE**, esta enzima está presente en aproximadamente el 25,25% de los espermatozoides, encontrándose aproximadamente unas 1148 enzimas por espermatozoide, mientras que la **APN** está presente en el 88,1% de los espermatozoides analizados, detectándose unas 4347 moléculas de APN por espermatozoide. En todos los casos, a pesar de que los valores de porcentajes máximo y mínimo muestran un amplio rango, el error estándar de la media deja ver que estos valores no difieren mucho los unos de los otros.

Análisis descriptivo de las enzimas del RAS analizadas				
	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
n	81	81	81	81
Media	25,25	1147,52	88,07	4346,74
Error estándar	1,73	91,31	0,87	309,14
Mediana	20,73	768,00	89,62	3963,00
Valor máximo	65,79	4102,00	98,88	10884,00
Valor mínimo	6,09	9,21	44,32	226,00

**Tabla 18.** Análisis descriptivo de los espermatozoides positivos para los porcentajes de espermatozoides positivos para la tACE y la APN y los valores medios de moléculas de tACE y APN por espermatozoide de las muestras seminales.

Seguidamente se analizó el tipo de distribución que seguían los datos de cada uno de los conjuntos de muestras, mediante un test de Kolmogorov-Smirnov, determinando que los distintos grupos de muestras no seguían una distribución normal ( $p < 0,01$ ).

## 2.1. Datos epidemiológicos de los varones y características de las muestras seminales

Los valores medios del conjunto de las muestras analizadas, así como los obtenidos de cada uno de los conjuntos de cada elemento del RAS analizado se muestran en la tabla 18. Se puede observar que tanto los datos epidemiológicos de edad de los varones, como los datos de laboratorio correspondientes a los parámetros seminales básicos analizados en un seminograma, muestran una alta homogeneidad entre los grupos (Tabla 19).

## Variables epidemiológicas de los varones y de laboratorio

	Total	ATR	PRR	ACE	APN	
Rango de edad (años)	26-52	26-51	32-52	32-52	32-52	
Media de edad (años)	40,04±0,35	40,15±0,5	39,39±0,45	40,25±0,50	39,54±0,478	
Volumen (mL)	En fresco	2,99±0,11	2,96±0,14	2,99±0,15	3,13±0,15	2,97±0,17
	Procesadas	0,76±0,02	0,75±0,02	0,76±0,02	0,76±0,02	0,77±0,02
Concentración (x10 <sup>6</sup> spz)	En fresco	73,83±2,96	70,16±3,70	75,31±4,05	76,91±4,29	78,31±4,63
	Procesadas	15,29±0,94	16,53±1,35	14,86±1,19	15,83±1,36	13,55±1,17
Movilidad PM (%)	En fresco	58,97±1,19	62,03±1,38	54,42±1,75	53,94±1,92	54,46±1,93
	Procesadas	93,50±0,39	92,70±0,51	94,67±0,49	94,19±0,58	94,58±0,57
Movilidad NP (%)	En fresco	6,12±0,47	5,17±0,37	7,67±0,76	7,89±0,88	8,04±0,86
	Procesadas	0,85±0,09	1,87±0,12	0,78±0,11	0,63±0,10	0,79±0,12
Movilidad IM (%)	En fresco	34,80±1,04	33,27±1,30	37,87±1,49	38,12±1,63	37,51±1,67
	Procesadas	5,64±0,38	6,41±0,49	4,54±0,49	5,17±0,58	4,62±0,56

**Tabla 19.** Variables epidemiológicas de los varones y de laboratorio de las muestras seminales. Se muestra la media ± ES del total de los casos y de los datos correspondientes a cada uno de los grupos de casos analizados en referencia a cada elemento del RAS estudiado.

## 2.2. Análisis de características seminales en relación con el AT2R, el PRR, la tACE y la APN

Se analizaron las asociaciones entre los componentes del RAS estudiados y los parámetros seminales básicos de las muestras de eyaculado (en fresco y tras su procesamiento) que se recogen en las tablas 20, 21, 22 y 23.

### 2.2.1. Volumen

En referencia a la relación entre el volumen de las muestras seminales y los componentes del RAS analizados, se encontraron distintas asociaciones con el AT2R, la tACE y la APN.

Se observó una correlación positiva muy significativa ( $p < 0,001$ ), entre el porcentaje de espermatozoides con **AT2R** y el volumen de las muestras procesadas (Tabla 21).

Por otra parte, la relación entre el **valor medio de moléculas de tACE** por espermatozoide también estaba positivamente correlacionada con el volumen de las muestras en fresco, siendo esta asociación estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) (Tabla 22). Igualmente, el porcentaje de espermatozoides positivos para la **APN** y el volumen de las muestras en fresco estaban negativamente correlacionados (Tabla 22), mientras que con las muestras procesadas mantenían una correlación positiva (Tabla 23), siendo estas asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

### 2.2.2. Concentración

El análisis de la relación entre la concentración de las muestras seminales mostró que todos los componentes del RAS analizados estaban relacionados con este parámetro.

El porcentaje de espermatozoides positivos para el **AT2R** mantenía una correlación positiva significativa ( $p < 0,05$ ) con la concentración de las muestras tanto en fresco (Tabla 20), como procesadas (Tabla 21). Mientras, que el porcentaje de espermatozoides positivos para el **PRR** mostraba una correlación negativa con la concentración de las muestras procesadas ( $p < 0,05$ ) (Tabla 21).

De igual manera, se vio que mientras el porcentaje de espermatozoides positivos para tACE no mostraba ninguna relación, el **valor medio de moléculas de tACE** por

espermatozoide estaba positivamente correlacionado con la concentración de las muestras procesadas (Tabla 23), siendo esta relación estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ). En cambio, en el caso de la **APN**, el porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima mantenía una correlación positiva con la concentración de las muestras procesadas ( $p < 0,01$ ) (Tabla 23). Mientras que el valor de la **media de moléculas de APN** por espermatozoide, mostró una correlación negativa con la concentración de las muestras procesadas ( $p < 0,01$ ) (Tabla 23).

### 2.2.3. Movilidad

En cuanto a las relaciones observadas entre la movilidad espermática y los receptores de RAS analizados, se determinó que todos los componentes del RAS analizados mostraban algún tipo de relación con este parámetro. Concretamente observamos que el porcentaje de espermatozoides positivos para el **AT2R** se correlacionaba positivamente con el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva (PR), tanto de las muestras de eyaculado en fresco ( $p < 0,01$ ) (Tabla 20), como tras su procesamiento ( $p < 0,01$ ) (Tabla 21); y consecuentemente mantenía una correlación negativa con el porcentaje de espermatozoides inmóviles (IM), tanto en las muestras en fresco ( $p < 0,01$ ) (Tabla 20), como procesadas ( $p < 0,01$ ) (Tabla 21). Por otra parte, el porcentaje de espermatozoides positivos para el **PRR**, mantenía una correlación positiva con los espermatozoides con movilidad no progresiva (NP) de las muestras procesadas ( $p < 0,01$ ) (Tabla 21).

En el caso de la **tACE**, los datos mostraban que el porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima mantenía una correlación positiva significativa con el porcentaje de espermatozoides inmóviles de las muestras en fresco ( $p < 0,05$ ) (Tabla 22). Mientras que la **media de moléculas de tACE** por espermatozoide estaban positivamente correlacionados con el porcentaje de los espermatozoides móviles no progresivos (NP) de las muestras en procesadas ( $p < 0,05$ ) (Tabla 23). Finalmente se analizaron las correlaciones de la APN con los distintos tipos de movilidad, obteniendo que el porcentaje de espermatozoides positivo para la **APN** mantenía una correlación positiva con el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva (PR) de las muestras en fresco ( $p < 0,05$ ) (Tabla 22), y una correlación negativa, con el porcentaje de espermatozoides inmóviles (IM) de las muestras en fresco ( $p < 0,05$ ) (Tabla 22), poseyendo ambas significación estadística. Sin embargo, la **media de moléculas de APN** se correlacionaba positivamente con el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos (PR) ( $p < 0,01$ ) (Tabla 22) y negativamente

con el porcentaje de los espermatozoides móviles no progresivos (NP) de las muestras en fresco ( $p < 0,01$ ) (Tabla 22), y positivamente con el porcentaje de las procesadas ( $p < 0,05$ ) (Tabla 23), siendo todas estas relaciones estadísticamente significativas.

Estas correlaciones, demuestran la existencia de una asociación entre los parámetros seminales básicos de volumen, concentración y los diferentes tipos de movilidad espermática, con los distintos componentes del RAS estudiados.

Correlaciones de Spearman de las muestras en fresco			
		AT2R	PRR
Volumen	Coef. correlación	0,085	0,136
	p	0,406	0,185
Concentración	Coef. correlación	0,285**	-0,091
	p	0,005	0,373
Movilidad progresiva (PR)	Coef. correlación	0,308**	0,087
	p	0,002	0,399
Movilidad no progresiva (NP)	Coef. correlación	-0,112	0,035
	p	0,274	0,736
Inmovilidad (IM)	Coef. correlación	-0,289**	-0,089
	p	0,004	0,384

**Tabla 20.** Correlaciones de Spearman de las características seminales de las muestras en fresco con los valores de porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R y el PRR. \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

Correlaciones de Spearman de las muestras procesadas			
		AT2R	PRR
Volumen	Coef. correlación	0,378**	-0,109
	p	0,000	0,286
Concentración	Coef. correlación	0,379**	-0,259*
	p	0,000	0,010
Movilidad progresiva (PR)	Coef. correlación	0,290**	-0,081
	p	0,004	0,428
Movilidad no progresiva (NP)	Coef. correlación	0,048	0,274**
	p	0,638	0,007
Inmovilidad (IM)	Coef. correlación	-0,325**	-0,025
	p	0,001	0,811

**Tabla 21.** Correlaciones de Spearman de las características seminales de las muestras tras ser procesadas, con los valores de porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R y el PRR. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,001$ ).

## Resultados

Correlaciones de Spearman de las muestras en fresco					
		tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Volumen	Coef. Correlación	-0,036	0,341**	-0,276*	0,091
	p	0,752	0,002	0,013	0,419
Concentración	Coef. correlación	-0,148	-0,207	0,217	-0,049
	p	0,189	0,063	0,052	0,667
Movilidad progresiva (PR)	Coef. correlación	-0,216	0,082	0,258*	0,253*
	p	0,052	0,465	0,020	0,023
Movilidad no progresiva (NP)	Coef. correlación	0,104	0,013	0,019	-0,262*
	p	0,357	0,905	0,864	0,018
Inmovilidad (IM)	Coef. correlación	0,229*	-0,110	-0,286**	-0,174
	p	0,040	0,329	0,010	0,120

**Tabla 22.** Correlaciones de Spearman de las características seminales de las muestras en fresco con porcentajes de espermatozoides positivos para la tACE y la APN y los valores medios de moléculas de tACE y APN por espermatozoide de las muestras seminales. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

Correlaciones de Spearman de las muestras procesadas					
		tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Volumen	Coef. correlación	-0,111	-0,130	0,365**	-0,035
	p	0,325	0,249	0,001	0,753
Concentración	Coef. correlación	-0,045	-0,544**	0,488**	-0,403**
	p	0,689	0,000	0,000	0,000
Movilidad progresiva (PR)	Coef. correlación	-0,093	-0,005	0,170	0,070
	p	0,410	0,967	0,129	0,533
Movilidad no progresiva (NP)	Coef. correlación	-0,025	0,227*	0,011	0,221*
	p	0,825	0,042	0,926	0,047
Inmovilidad (IM)	Coef. correlación	0,150	-0,098	-0,131	-0,182
	p	0,183	0,383	0,245	0,104

**Tabla 23.** Correlaciones de Spearman de las características seminales de las muestras tras ser procesadas con porcentajes de espermatozoides positivos para la tACE y la APN y los valores medios de moléculas de tACE y APN por espermatozoide de las muestras seminales. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

### 2.3. Análisis de las distintas etiologías seminales en relación con el AT2R, el PRR, la tACE y la APN

Para comprobar si tanto los receptores AT2R y PRR, como las enzimas tACE y APN, están relacionados con las etiologías seminales, se compararon los valores de espermatozoides positivos para estos componentes del RAS, así como los valores de la media de moléculas de estas enzimas por espermatozoide, determinados en las diferentes patologías seminales (Figuras 21 y 22). Para ello se catalogaron las muestras en cuatro grupos de acuerdo con las etiologías descritas por la OMS (OMS, 2010): normozoospermicos (NZ), astenozoospermicos (AZ), teratozoospermicos (TZ) y oligozoospermicos (OZ).

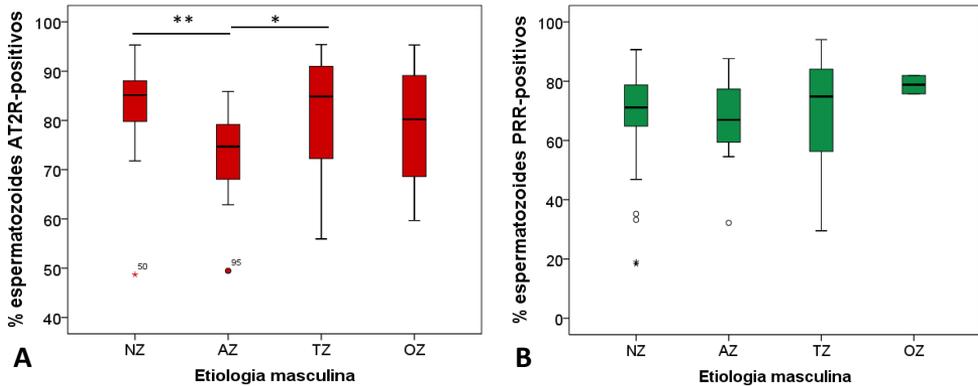
En la tabla 24 se muestran los valores de las medianas de los elementos del RAS analizados, el número de casos pertenecientes a cada una de estas etiologías seminales (entre paréntesis), para cada elemento de RAS analizado, así como la significación estadística obtenida mediante el test de Kruskal-Wallis.

Aunque el análisis de Kruskal Wallis determinó que no existían diferencias con significación estadística entre el porcentaje de células positivas para el **AT2R** y las distintas etiologías, debido a la proximidad de obtener un valor estadísticamente significativo ( $p=0,063$ ) (Figura 21A), se decidió analizar las diferencias entre las etiologías mediante el test de U de Mann-Whitney. Este test demostró que había diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes clasificados como AZ y los NZ y TZ ( $p<0,01$  y  $p<0,05$ , respectivamente), siendo el porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R significativamente menor en pacientes AZ en comparación con los otros grupos.

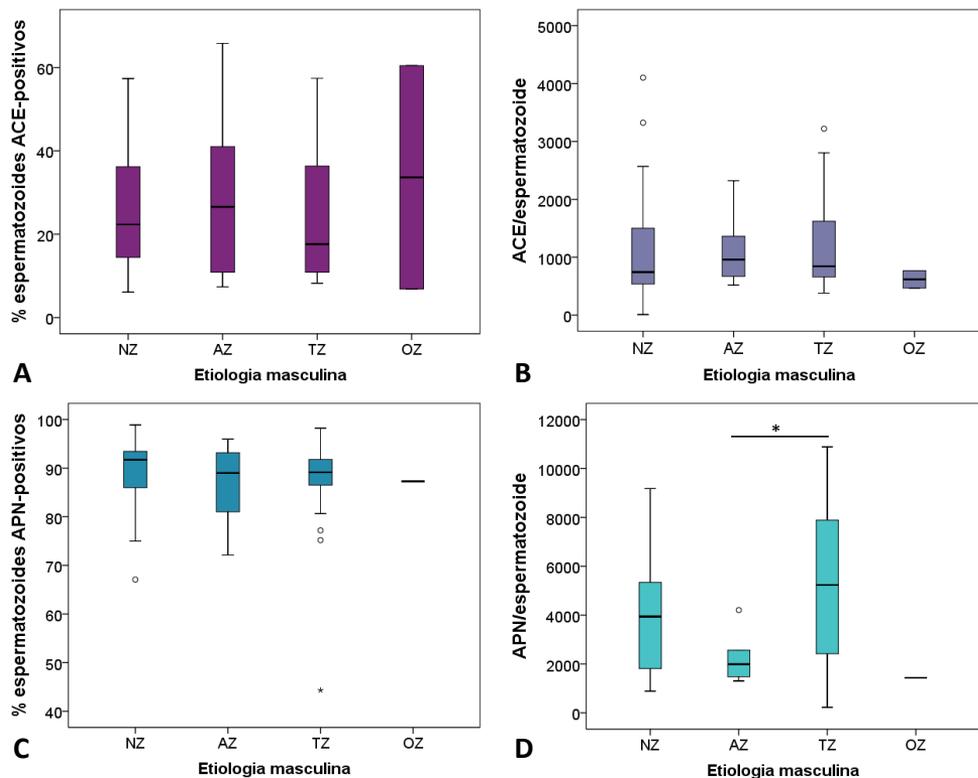
Igualmente, en la tabla 24 se observa que la **media de moléculas de APN** por espermatozoide y los distintos grupos de etiologías seminales presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) (Figura 22D). Los tests de U de Mann-Whitney, determinaron que estas diferencias se encontraban entre los pacientes clasificados como AZ y los TZ ( $p<0,05$ ), y que tenían significación estadística. Siendo menor la media de enzima APN por espermatozoide en el caso de los AZ.

Etiologías seminales						
	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
NZ	85,14 (45)	71,17 (49)	22,34 (45)	743(45)	91,71 (43)	3941 (43)
AZ	74,69 (8)	66,98 (7)	26,57 (6)	959 (6)	89,00 (6)	1988 (6)
TZ	84,87 (40)	74,84 (39)	17,61 (28)	843 (28)	89,14 (31)	5232 (31)
OZ	80,20 (4)	78,84(2)	33,65 (2)	617 (2)	87,27 (1)	1437 (1)
p (KW)	0,063	0,528	0,808	0,580	0,677	0,036*

**Tabla 24.** Valores de las medianas de las distintas etiologías masculinas analizadas para cada elemento del RAS estudiado. Entre paréntesis se indica el número de casos incluidos en cada uno de los grupos. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de Kruskal Wallis. \* diferencias significativas (p<0,05).



**Figura 21.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR, observados en las distintas etiologías seminales. NZ: normozoospermicos; AZ: astenozoospermicos; TZ: teratozoospermicos; y OZ: oligozoospermicos. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).



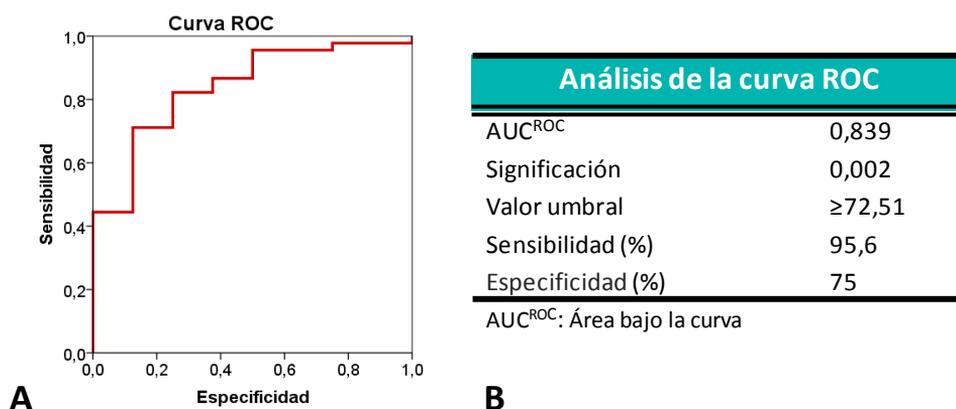
**Figura 22.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide, observados en las distintas etiologías seminales. NZ: normozoospermicos; AZ: astenozoospermicos; TZ: teratozoospermicos; y OZ: oligozoospermicos. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 2.3.1. Estimación del poder predictivo de los componentes del RAS en las etiologías seminales

Teniendo en cuenta estas diferencias observadas entre las distintas etiologías, se decidió examinar si tanto el AT2R como la ANP podrían tener valor predictivo en la determinación de dichas etiologías. Para lo cual se realizaron análisis mediante curvas ROC.

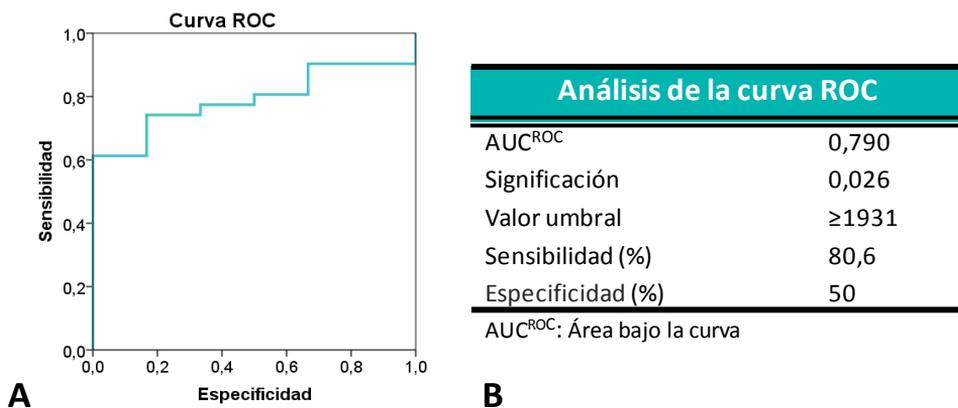
En el caso del **AT2R**, la aplicación de este estadístico perseguía determinar si el porcentaje de espermatozoides positivos para este receptor podría servir como valor predictivo de la patología seminal asociada a la baja movilidad espermática. Para ello se realizó un análisis mediante la curva ROC entre los valores de las muestras de los pacientes NZ y los AZ (Figura 23).

Este análisis mostró un valor de área bajo la curva (AUC) del 0,839 (Figura 23B). Teniendo en cuenta que un valor de  $AUC > 0,8$  se considera aceptable, el AT2R poseería un buen poder predictivo como test clínico para discernir de una forma objetiva entre muestras con buena y mala movilidad espermática. Se determinó un valor de corte para diferenciar entre muestras NZ y AZ del 72,51% de espermatozoides positivos para el AT2R, teniendo una sensibilidad (capacidad de identificar muestras NZ) del 95,6% y una especificidad (capacidad de identificar muestras AZ) del 75% (Figura 23A).



**Figura 23.** A) Imagen de la curva ROC de los porcentajes de espermatozoides positivos para el AT2R entre los pacientes normozoospermicos y los astenozoospermicos. B) Datos de área bajo la curva, significación, valor umbral, sensibilidad y especificidad obtenidos de este análisis.

Por otra parte, se evaluó si la determinación del valor medio de moléculas de APN por espermatozoide podría servir para discernir entre las muestras de pacientes AZ y los TZ (Figura 24A). En el análisis mediante la curva ROC, se obtuvo un valor de área bajo la curva (AUC) del 0,79 (Figura 24B). Lo que indica que el valor medio de moléculas de APN por espermatozoide no posee valor predictivo para diferenciar de una forma objetiva entre muestras de pacientes con AZ y TZ. Debido a la proximidad de tener valor predictivo para diferenciar pacientes con AZ de los que tienen TZ, se estableció un valor de corte de 1931 moléculas de APN por espermatozoide. Sin embargo, debido a la especificidad y sensibilidad que poseería se evidencia su nulo valor como test predictivo.



**Figura 24. A)** Imagen de la curva ROC de los valores medios de moléculas de APN entre los pacientes astenozoospermicos y los teratozoospermicos. **B)** Datos de área bajo la curva, significación, valor umbral, sensibilidad y especificidad obtenidos de este análisis.

### **2.4. Resumen de los resultados del segundo objetivo**

#### **2.4.1. AT2R**

Tras el análisis de los resultados se puede ver como el AT2R está asociado con los parámetros seminales básicos. Así, un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R se correlaciona con un mayor volumen de las muestras procesadas, y con una mayor concentración y movilidad progresiva de las muestras en fresco y procesadas. Además, su relación con la movilidad se ve apoyada con la observación de que las muestras seminales de los pacientes astenozoospermicos tienen un menor porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R que las muestras de pacientes normozoospermicos. Además, posee significación estadística como valor predictivo para diferenciar muestras de pacientes astenozoospermicos de normozoospermicos.

#### **2.4.2. PRR**

En cuanto al PRR, se ha visto que está asociado con los parámetros seminales de concentración y movilidad de las muestras procesadas. De esta forma, la presencia de un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para el PRR se correlaciona con una menor concentración seminal y un mayor porcentaje espermatozoides de movilidad no progresiva.

#### **2.4.3. tACE**

En relación a la tACE, se ha visto que está asociada con los parámetros seminales de volumen, concentración y movilidad. Así, un mayor número de moléculas de tACE por espermatozoide se correlacionan con mayor volumen de las muestras en fresco. En cuanto a la concentración, las muestras con mayores valores medios de moléculas de tACE por espermatozoide se asocian a una menor concentración y a un mayor porcentaje de espermatozoides de movilidad no progresiva en las muestras procesadas. Por otra parte, un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para la tACE se correlaciona con un mayor porcentaje espermatozoides inmóviles en las muestras en fresco.

#### 2.4.4. APN

Finalmente, la APN está relacionada con todos los parámetros seminales básicos. Así, se vio que cuanto mayor es el porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima se correlaciona con un menor volumen de la muestra seminal en fresco, pero mayor en las muestras procesadas. Asimismo, un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para la APN se correlaciona con una mayor concentración de las muestras procesadas. Contrariamente, un mayor número de moléculas de APN se asocia a una menor concentración de las muestras procesadas. En último lugar, en relación a la movilidad, un porcentaje mayor de espermatozoides positivos para APN se asocia con un mayor porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva, y con un menor porcentaje de espermatozoides inmóviles en las muestras en fresco. Por otro lado, cuanto mayor es el número de moléculas de APN por espermatozoide mayor es el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y menor porcentaje de espermatozoides con movilidad no progresiva en las muestras en fresco. Sin embargo, en las muestras procesadas un mayor número de moléculas de APN se correlaciona con un mayor porcentaje de espermatozoides con movilidad no progresiva.

Por otra parte, esta relación con la movilidad, se constata al ver que los pacientes astenozoospermicos tienden a presentar unos menores niveles de moléculas de APN por espermatozoide en comparación con las demás etiologías seminales estudiadas.

### 3. Relación de AT2R, PRR, tACE y APN con los parámetros embrionarios

#### 3.1. Datos epidemiológicos de las pacientes y variables de laboratorio

En este tercer objetivo, se analizaron los embriones procedentes de un total de 173 parejas incluidas en el programa de donación de oocitos. Los datos descriptivos del conjunto de muestras y los pertenecientes a cada uno de los componentes del RAS analizados están representados en la tabla 25. Hay que tener en cuenta que la edad de la paciente hace referencia a la edad de la receptora de los oocitos donados.

Variables epidemiológicas de las pacientes y de la laboratorio					
	Total	AT2R	PRR	tACE	APN
n	173	97	97	81	81
Rango de edad (años)	24-50	24-50	30-46	31-46	31-46
Media de edad (años)	39,55±0,32	39,37±4,67	39,3 ±3,39	39,57±4,07	39,38±4,05
Nº oocitos obtenidos	2199	1301	1161	991	953
Nº medio oocitos donados/paciente	12,71±0,25	13,41±0,35	11,97±0,32	12,23±0,36	11,77±0,34
N oocitos maduros	1924	1133	1038	883	843
Nº medio oocitos maduros/paciente	11,12±0,21	11,68±0,28	10,70±0,32	10,90±0,36	10,41±0,29
Nº oocitos fecundados	1397	825	755	635	611
Nº medio embriones/paciente	8,08±0,20	8,51±0,28	7,80±0,28	7,86±0,31	7,57±0,28
Tasa de fecundación (%)	72,61	72,81	72,74	71,91	72,48

**Tabla 25.** Variables epidemiológicas de las pacientes y de laboratorio. Se muestra la media ± ES del total de los casos y de los datos correspondientes a cada uno de los grupos de casos analizados en referencia a cada elemento del RAS estudiado.

Se puede observar que tanto los datos epidemiológicos correspondientes a la edad de los pacientes, como todos los datos de laboratorio de número de oocitos obtenidos en las punciones, número de oocitos maduros, número de embriones obtenidos por cada paciente, así como las tasas de fecundación de los distintos elementos del RAS analizados en los espermatozoides, son muy homogéneos.

Seguidamente, se analizó el tipo de distribución que seguían los datos de cada uno de los conjuntos de muestras, mediante un test de Kolmogorov-Smirnov. Este test determinó, que los distintos grupos de muestras no seguían una distribución normal ( $p < 0,01$ ).

### 3.2. Relación de las tasas de fecundación con el AT2R, el PRR, la tACE y la APN

En los 173 casos analizados en este estudio, la técnica de fecundación más empleada fue la ICSI. De los 173 ciclos, la ICSI fue la única técnica usada en 160, mientras que la técnica de FIV, conjuntamente con la ICSI (FIV/ICSI), se llevó a cabo en 13 ciclos.

Se estudiaron las tasas de fecundación de cada cohorte oocitaria en función de la técnica de fecundación *in vitro* usada, para cada uno de los componentes del RAS analizados en los espermatozoides (Tablas 26 y 27). Se observó una correlación positiva significativa entre los oocitos fecundados mediante la técnica de FIV y el porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R ( $p < 0,05$ ). Mientras que en el resto de los elementos del RAS estudiados no se observó ninguna relación con las tasas de fecundación. Así, estos datos demuestran que las muestras seminales que presentan un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R tienen mayores tasas de fecundación mediante técnicas de FIV.

Tasas de fecundación en relación a los receptores del RAS analizados			
		AT2R	PRR
Total (ICSI +FIV/ICSI)	Coef. correlación	-0,031	-0,130
	p	0,761	0,204
	n	97	97
Sólo ICSI	Coef. correlación	-0,065	-0,106
	p	0,529	0,301
	n	97	97
Sólo FIV	Coef. correlación	0,735*	-0,231
	p	0,038	0,618
	n	8	7

**Tabla 26.** Correlaciones de Spearman de las tasas de fecundación dependiendo de la TRA usada y el porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R y el PRR. n: tamaño muestral; p: significación bilateral. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Tasas de fecundación en relación a las enzimas del RAS analizadas						
			tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Total (ICSI +FIV/ICSI)	Coef. correlación		-0,128	0,067	0,005	-0,046
	p		0,256	0,554	0,962	0,685
	n		81	81	81	81
Sólo ICSI	Coef. correlación		-0,121	0,054	-0,001	-0,046
	p		0,282	0,632	0,992	0,683
	n		81	81	81	81
Sólo FIV	Coef. correlación		-0,247	0,579	0,410	-0,359
	p		0,637	0,228	0,493	0,553
	n		6	6	5	5

**Tabla 27.** Correlaciones de Spearman de las tasas de fecundación dependiendo de la TRA usada y el porcentaje de espermatozoides positivos para la tACE y la APN y los valores medios de moléculas de tACE y APN por espermatozoide de las muestras seminales. n: tamaño muestral; p: significación bilateral.

### 3.3. Relación del desarrollo embrionario temprano con el AT2R, el PRR, la tACE y la APN

#### 3.3.1. Embriones en día 2 de desarrollo

##### 3.3.1.1. Calidad embrionaria

En referencia a la calidad de los embriones en D+2 de desarrollo, se analizó si los receptores AT2R y PRR, o las enzimas tACE y APN presentes en los espermatozoides estaban relacionados con las diferentes calidades embrionarias descritas por ASEBIR (ASEBIR, 2008). En la tabla 28, están representados los valores de las medianas, el número de embriones clasificados en cada una de las categorías, así como la significación obtenida mediante el test de Kruskal Wallis para cada uno de los elementos del RAS analizados en los espermatozoides.

Como se puede observar en la tabla 28, aunque las diferencias entre los porcentajes de espermatozoides positivos para el **AT2R** de las calidades embrionarias no eran estadísticamente significativas, debido a la proximidad de obtener un valor significativo ( $p=0,062$ ), se decidió realizar el test de U de Mann-Whitney. Este test demostró que había diferencias estadísticamente significativas entre los embriones clasificados con calidad B y los de calidad C ( $p<0,01$ ) (Figura 25A). Esto implica que en D+2 de desarrollo, los embriones de calidad B provienen

de muestras con un menor porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R que los embriones de calidad C.

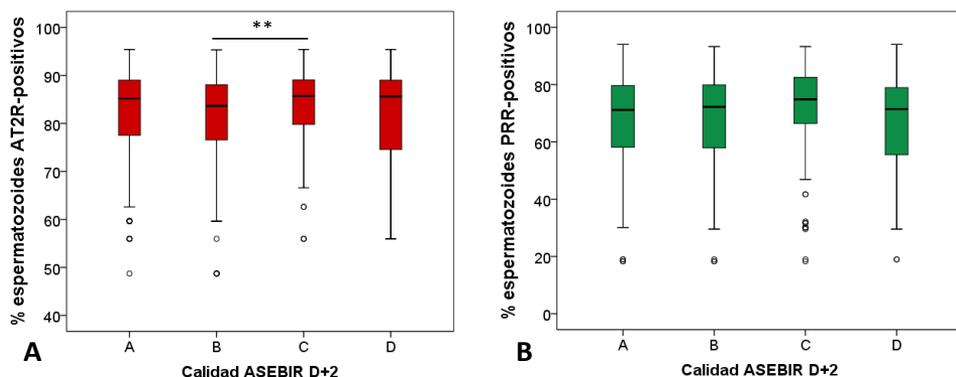
En relación a la **tACE**, se observaron diferencias entre los porcentajes de espermatozoides positivos para la tACE de las distintas calidades embrionarias ( $p < 0,05$ ) (Tabla 28). Los tests de U de Mann-Whitney mostraron que estas diferencias se daban entre los embriones de calidad D y los de calidades A y B ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente) (Figura 26A). Estos datos revelan que en D+2, los embriones de calidad D provienen de muestras con un menor porcentaje de espermatozoides positivos para la tACE, que los embriones de calidades A y B.

Finalmente, tras el análisis de Kruskal-Wallis se determinó que también existían diferencias estadísticamente significativas entre la **media de moléculas de APN** por espermatozoide y las distintas calidades embrionarias ( $p < 0,01$ ). Debiéndose estas diferencias, a las halladas entre los embriones de calidad A y los de calidad B ( $p < 0,05$ ) y a las de los embriones de calidad D y los de calidades A, B y C ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  y  $p < 0,05$ , respectivamente). Estos datos muestran por un lado, que en D+2, los embriones de calidad D provienen de muestras que presentan un mayor número de moléculas de APN por espermatozoide respecto al resto de embriones. Y por otro lado, que los embriones de calidad B provienen de muestras seminales con menos moléculas de APN que los embriones clasificados con calidad A (Figura 26D).

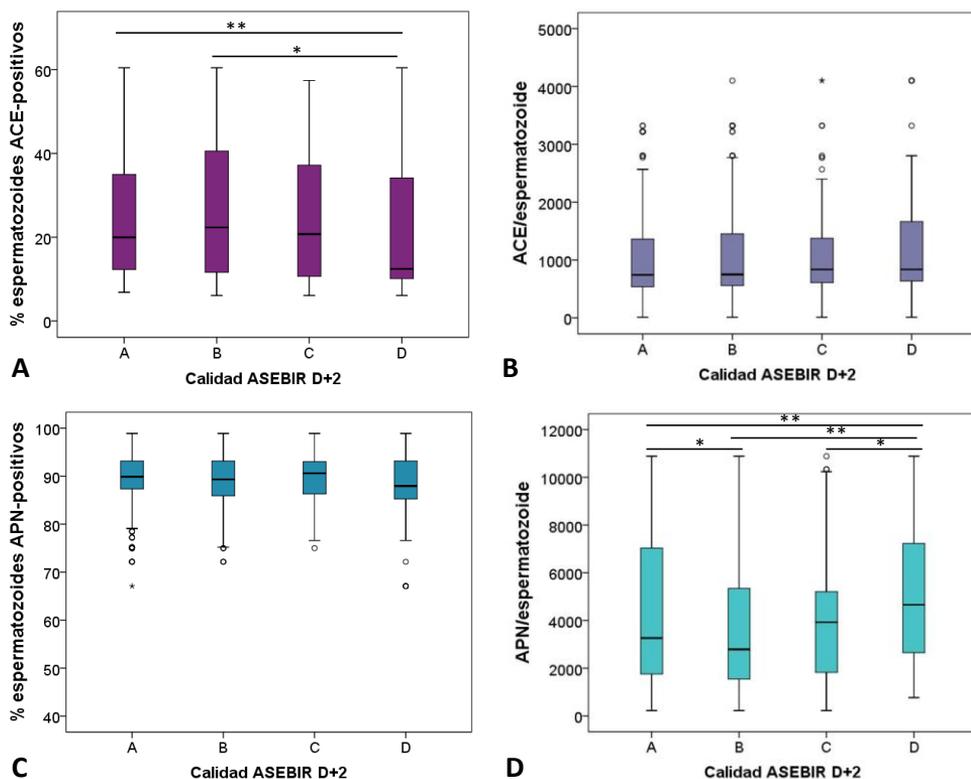
Calidad embrionaria en D+2						
Calidad	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
A	85,14 (360)	71,17 (311)	19,96 (253)	742 (253)	89,87 (261)	3262 (261)
B	83,63 (248)	72,21 (225)	23,34 (204)	749 (204)	89,31 (181)	2789 (181)
C	85,66 (114)	74,84 (98)	20,73 (83)	838 (83)	90,59 (76)	3923 (76)
D	85,58 (103)	71,46 (121)	12,44 (95)	838 (95)	87,94 (93)	4659 (93)
<b>p (KW)</b>	0,062	0,223	0,034*	0,630	0,219	0,002**

**Tabla 28.** Valores de las medianas de los embriones en D+2 de desarrollo agrupados en los grupos de las calidades embrionarias para cada elemento de RAS estudiado en espermatozoides. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de Kruskal Wallis. \* diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\* diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

## Resultados



**Figura 25.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en los grupos de las calidades embrionarias propuestas por ASEBIR (ASEBIR, 2008) en las que han sido clasificados los embriones en D+2 de desarrollo. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).



**Figura 26.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide, en los grupos de las calidades embrionarias propuestas por ASEBIR (ASEBIR, 2008) en las que han sido clasificados los embriones en D+2 de desarrollo. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

### 3.3.1.2. Número de células

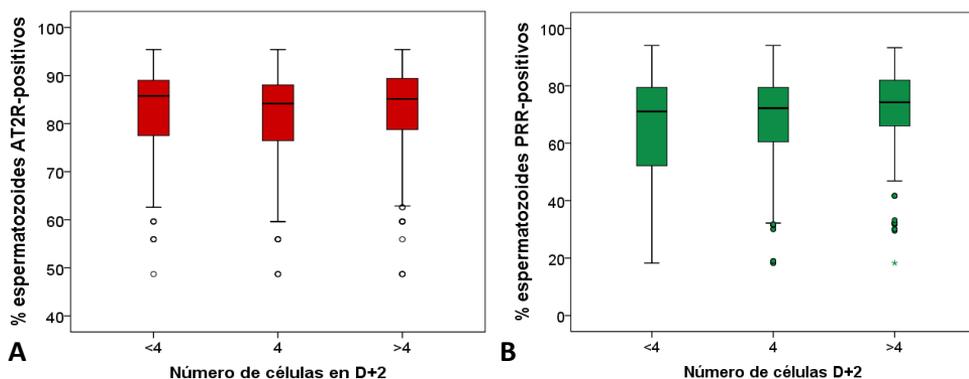
Considerando que los embriones compuestos por 4 células en D+2 son los que presentan el mayor potencial de implantación (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015), se distinguieron tres grupos de embriones en función del número de células por las que estaban formados. Estos grupos corresponden a: 1) embriones formados por menos de 4 blastómeros; 2) embriones formados por 4 blastómeros y 3) embriones con más de 4 blastómeros. Los datos de las medianas de estas agrupaciones, junto con el número de embriones clasificados en cada grupo (entre paréntesis), y la significación obtenida mediante el test de Kruskal Wallis para cada uno de los elementos del RAS analizados en los espermatozoides, se presentan en la tabla 29.

No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de embriones en D+2 de desarrollo en base al número de células por el que estaban compuestos, en los distintos componentes del RAS analizados en los espermatozoides (Figuras 27 y 28).

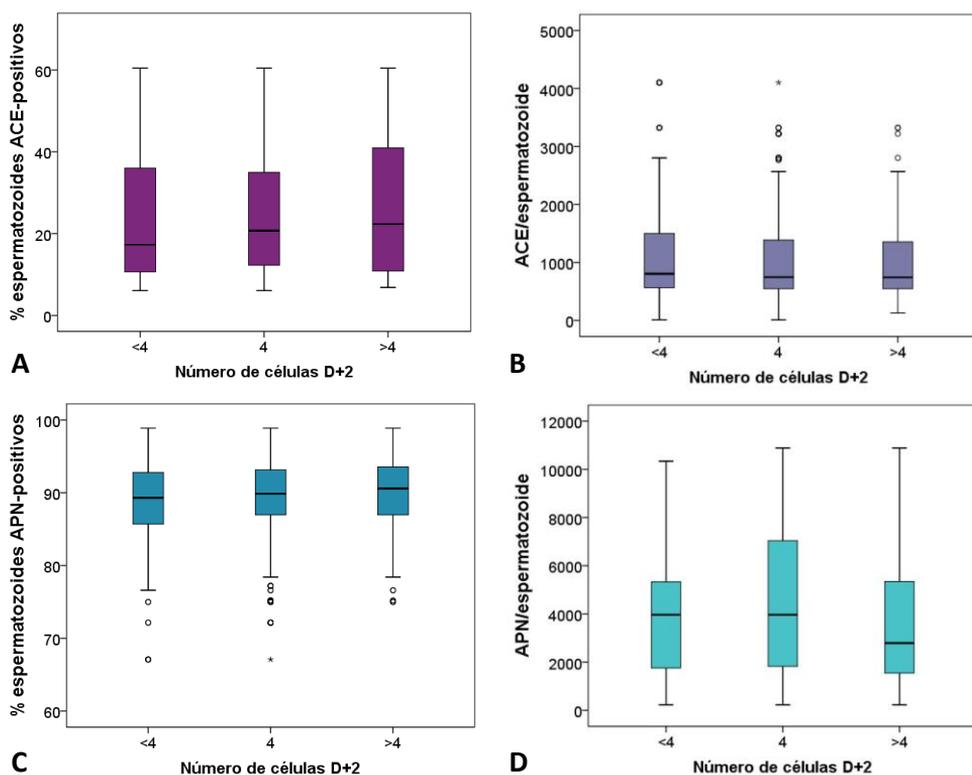
Número de células de los embriones en D+2						
Nº de células	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
<4	85,76 (211)	71,07 (248)	17,31 (206)	804 (206)	89,31 (196)	3963 (196)
4	84,16 (444)	72,23 (379)	20,73 (318)	745 (318)	89,87 (323)	3963 (323)
>4	85,14 (170)	74,23 (128)	22,34 (111)	742 (111)	90,59 (92)	2789 (92)
p (KW)	0,184	0,086	0,349	0,850	0,100	0,282

**Tabla 29.** Valores de las medianas de los distintos componentes del RAS analizados en los espermatozoides de las tres agrupaciones de embriones en D+2 según el número de células por el que están compuestos. <4: embriones compuestos por menos de 4 células; 4: embriones formados por 4 células; >4: embriones formados por más de 4 células. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de Kruskal Wallis. \* diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\* diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

## Resultados



**Figura 27.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR de las tres agrupaciones de embriones en D+2 según el número de células por el que están compuestos. <4: embriones compuestos por menos de 4 células; 4: embriones formados por 4 células; >4: embriones formados por más de 4 células.



**Figura 28.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide de las tres agrupaciones de embriones en D+2 según el número de células por el que están compuestos. <4: embriones compuestos por menos de 4 células; 4: embriones formados por 4 células; >4: embriones formados por más de 4 células.

### 3.3.1.3. Número de células, fragmentación y simetría de las cohortes embrionarias

Las tablas 30 y 31 muestran los resultados hallados tras realizar el análisis de correlaciones bivariadas entre los parámetros de número de células, fragmentación y simetría observados en las cohortes embrionarias en D+2 y los distintos componentes del RAS estudiados en los espermatozoides.

El **AT2R** fue el único componente del RAS que mostró una correlación positiva significativa ( $p < 0,05$ ) entre el porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R y el porcentaje de fragmentación de los embriones en D+2 de desarrollo. Indicando que un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para este receptor se correlaciona con un mayor porcentaje de fragmentación en la cohorte embrionaria.

Correlaciones de Spearman de los parámetros de la cohorte embrionaria en D+2 de desarrollo			
		AT2R	PRR
Nº células	Coef. correlación	0,019	0,084
	p	0,853	0,423
Fragmentación	Coef. correlación	0,207*	0,071
	p	0,042	0,490
Simetría	Coef. correlación	0,032	0,050
	p	0,758	0,627

**Tabla 30.** Correlaciones de Spearman de los parámetros embrionarios analizados en D+2 y el porcentaje medio de espermatozoides positivos para el AT2R y el PRR. p: significación bilateral. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Correlaciones de Spearman de los parámetros de la cohorte embrionaria en D+2 de desarrollo					
		tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Nº células	Coef. correlación	0,068	-0,059	0,141	-0,071
	p	0,553	0,605	0,217	0,535
Fragmentación	Coef. correlación	-0,196	0,034	0,099	0,130
	p	0,080	0,762	0,381	0,361
Simetría	Coef. correlación	-0,091	0,150	-0,102	0,133
	p	0,421	0,181	0,366	0,235

**Tabla 31.** Correlaciones de Spearman de los parámetros embrionarios analizados en D+2 con porcentajes de espermatozoides positivos para tACE y APN y los valores medios de moléculas de tACE y APN por espermatozoide de las muestras seminales. p: significación bilateral.

### 3.3.2. Embriones en día 3 de desarrollo

#### 3.3.2.1. Calidad embrionaria

Se analizó si los receptores AT2R y PRR, o las enzimas tACE y APN presentes en los espermatozoides, estaban relacionados con la calidad de los embriones en D+3 de desarrollo, según la gradación propuesta por ASEBIR (ASEBIR, 2008). En la tabla 32 están representados los valores de las medianas, el tamaño muestral de cada uno de los grupos de calidad en los que se han clasificado a los embriones (entre paréntesis), así como la significación obtenida mediante el test de Kruskal Wallis para cada uno de los elementos del RAS analizados en los espermatozoides.

Calidad embrionaria en D+3						
Calidad	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
A	82,92 (188)	71,17 (166)	21,34 (130)	748 (130)	89,70 (142)	3262 (142)
B	83,85 (261)	72,22 (206)	21,34 (178)	713 (178)	89,87 (161)	3103 (161)
C	86,74 (146)	73,29 (143)	22,49 (129)	857 (129)	89,65(120)	3103 (120)
D	85,85 (230)	71,93 (240)	16,88 (198)	768 (198)	89,62(188)	4305 (188)
p (KW)	0,024*	0,557	0,032*	0,210	0,900	0,067

**Tabla 32.** Valores de las medianas de los embriones en D+3 de desarrollo agrupados en función de su calidad embrionarias para cada elemento de RAS estudiado. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de Kruskal Wallis. \* diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

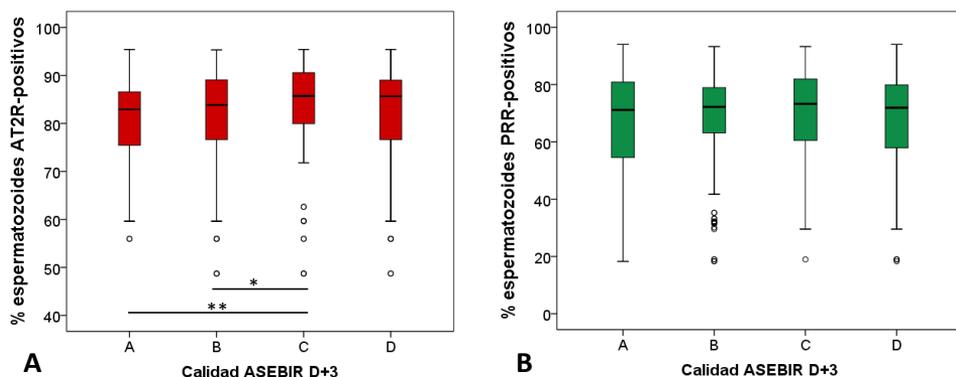
Como se puede ver en la tabla 32, el análisis de Kruskal Wallis determinó que existían diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de espermatozoides positivos para el **AT2R** de las distintas calidades ( $p < 0,05$ ). Posteriormente, el análisis de U de Mann-Whitney mostró que éstas, se dan entre los embriones de calidad C y los de calidades A y B ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) (Figura 29A). Estos datos indican que, en D+3, los embriones clasificados con calidad C provienen de muestras con un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R que los embriones de calidades A y B.

En relación a la **tACE**, se observaron diferencias entre los porcentajes de espermatozoides positivos que dieron lugar a los embriones de cada una de las calidades embrionaria descritas ( $p < 0,05$ ) (Tabla 32). Concretamente, estas

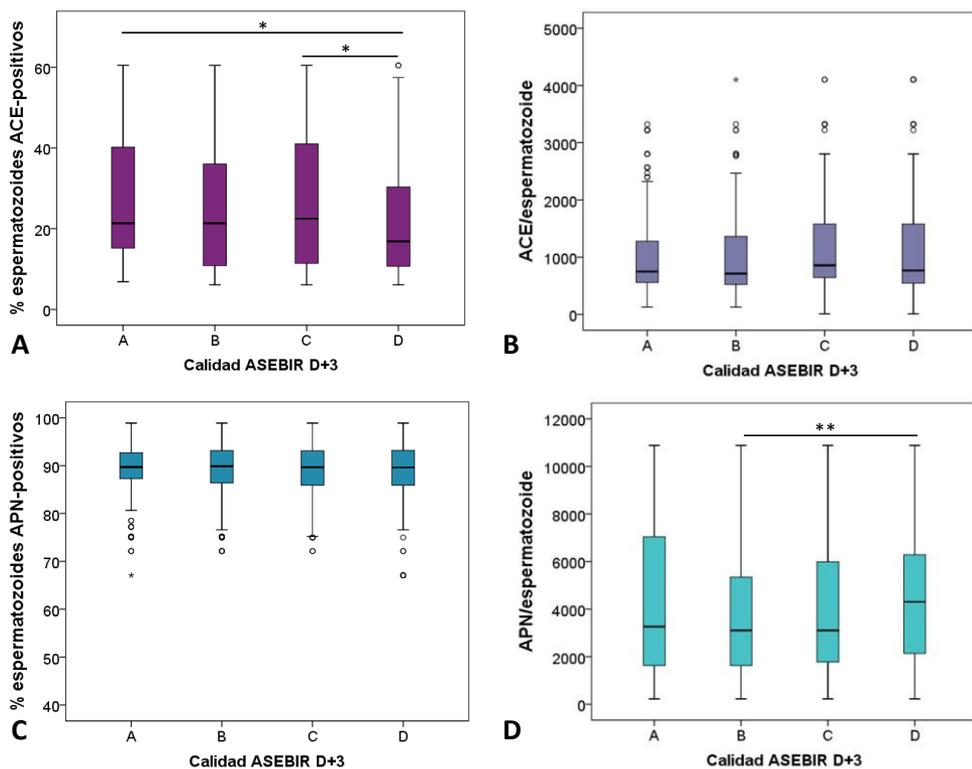
diferencias se determinaron entre los embriones clasificados con calidad D y los de calidades A y C (ambos  $p < 0,05$ ) (Figura 30A). Estos datos revelan que en D+3, los embriones de calidad D provienen de muestras con un menor porcentaje de espermatozoides positivos para la tACE, que los embriones de calidades A y C.

Finalmente, el análisis de Kruskal Wallis determinó que no existían diferencias estadísticamente significativas, entre la **media de APN** por espermatozoide y los distintos grupos de calidades embrionarias (Tabla 32). Sin embargo, debida a la proximidad de obtener un valor significativo ( $p = 0,067$ ), se decidió analizar las diferencias mediante el test de U de Mann-Whitney. Este test determinó, en D+3 de desarrollo, los embriones de calidad D provienen de muestras con un mayor número de moléculas de APN que los embriones de calidad B ( $p < 0,01$ ) (Figura 30D).

## Resultados



**Figura 29.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR correspondientes a los grupos de las calidades embrionarias propuestas por ASEBIR (ASEBIR, 2008) en las que han sido clasificados los embriones en D+3 de desarrollo. \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).



**Figura 30.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide correspondientes a los grupos de las calidades embrionarias propuestas por ASEBIR (ASEBIR, 2008) en las que han sido clasificados los embriones en D+3 de desarrollo. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

### 3.3.2.2. Número de células

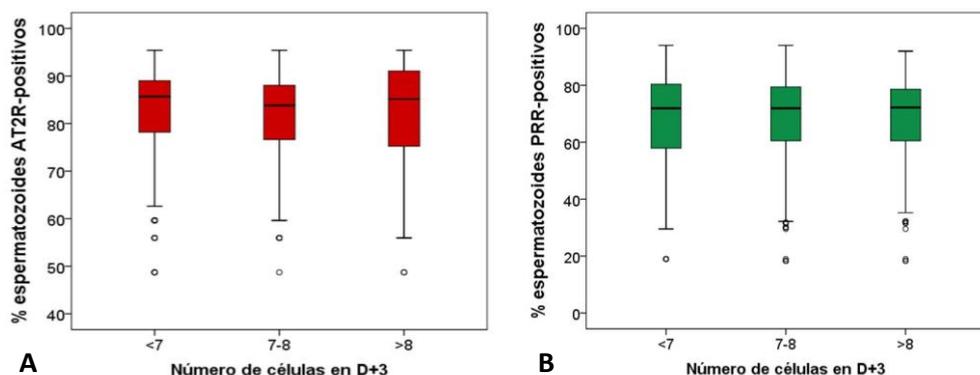
Teniendo en cuenta que los embriones compuestos por 7-8 células en D+3 son los que presentan una mayor capacidad de implantación (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015), se distinguieron tres grupos de embriones en función del número de células por las que estaban formados. Estos grupos se componen por: 1) embriones formados por menos de 7 blastómeros; 2) embriones formados por 7-8 blastómeros y 3) embriones con más de 8 blastómeros. En la tabla 33 se muestran los valores de las medianas, el número de embriones clasificados en cada uno de estos tres grupos, y la significación obtenida mediante el test de Kruskal Wallis para cada uno de los elementos del RAS analizados en los espermatozoides.

Tal y como se puede ver en la tabla 33, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de embriones en D+3 de desarrollo en base al número de células por el que están compuestos, en ninguno de los componentes del RAS analizados en los espermatozoides (Figuras 31 y 32).

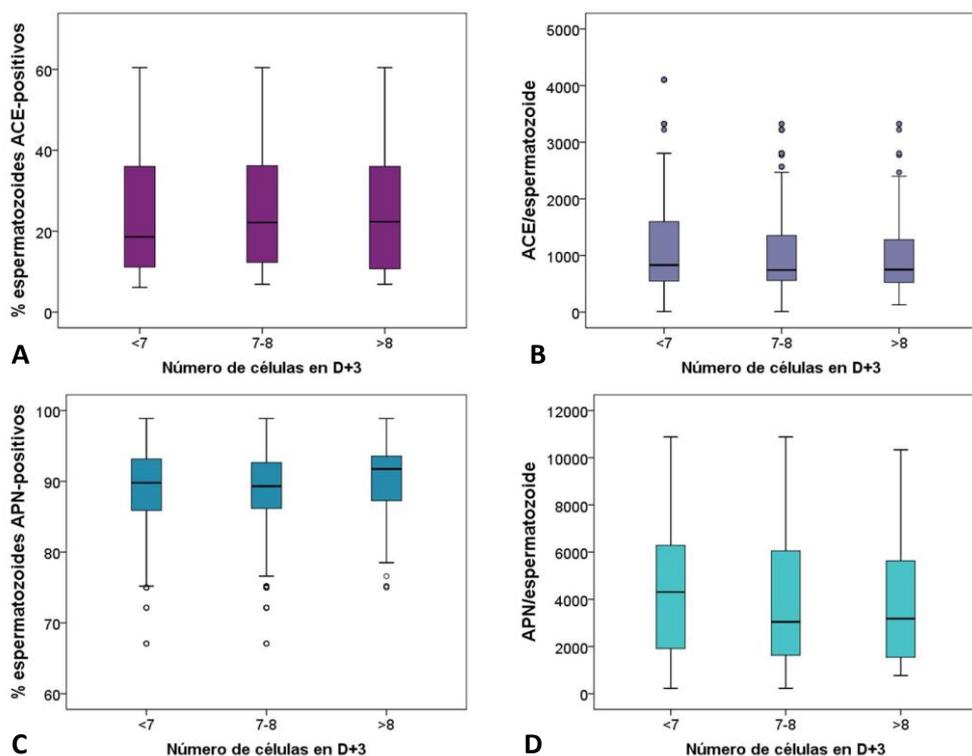
Número de células de los embriones en D+3						
Nº de células	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
<7	85,66 (290)	71,93 (300)	18,85 (256)	804 (256)	89,79 (252)	4305 (252)
7-8	83,82 (405)	71,93 (354)	20,73 (290)	748 (290)	89,31 (289)	3043 (289)
>8	85,14 (130)	72,21 (101)	22,34 (89)	749 (89)	91,74 (70)	3183 (70)
<b>p (KW)</b>	0,268	0,588	0,256	0,278	0,097	0,114

**Tabla 33.** Valores de las medianas de los distintos componentes del RAS analizados en los espermatozoides de las tres agrupaciones de embriones en D+3 según el número de células por el que están compuestos. <7: embriones compuestos por menos de 7 células; 7-8: embriones formados por 7-8 células; >8: embriones formados por más de 8 células. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de Kruskal Wallis.

## Resultados



**Figura 31.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR de las tres agrupaciones de embriones en D+3 según el número de células por el que están compuestos. <7: embriones compuestos por menos de 7 células; 7-8: embriones formados por 7-8 células; >8: embriones formados por más de 8 células.



**Figura 32.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide de las tres agrupaciones de embriones en D+3 según el número de células por el que están compuestos. <7: embriones compuestos por menos de 7 células; 7-8: embriones formados por 7-8 células; >8: embriones formados por más de 8 células.

### 3.3.2.3. Número de células, fragmentación y simetría de las cohortes embrionarias

Las tablas 34 y 35 detallan los resultados obtenidos tras realizar el análisis de correlaciones bivariadas entre los parámetros de número de células, fragmentación y simetría de las cohortes embrionaria en D+3 y los distintos componentes del RAS estudiados en los espermatozoides. Mientras que no se observa ninguna relación entre estos parámetros y los receptores del RAS estudiados (Tabla 34), sí que se ven diferencias con las enzimas del RAS analizadas (Tabla 35). Concretamente, el porcentaje de espermatozoides positivos para la **tACE** se correlaciona negativamente con el porcentaje de fragmentación ( $p < 0,05$ ); y el porcentaje de espermatozoides positivos para **APN** se correlaciona positivamente con la asimetría embrionaria ( $p < 0,05$ ). Así, un menor porcentaje de espermatozoides positivos para la tACE se correlaciona con un mayor porcentaje de fragmentación en la cohorte embrionaria, mientras que un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para la APN se correlaciona con mayor asimetría en la cohorte embrionaria (ya que las categorías de mayor valor corresponden a las de mayor asimetría).

Correlaciones de Spearman de parámetros embrionarios de la cohorte embrionaria en D+3 de desarrollo			
		AT2R	PRR
Nº células	Coef. correlación	0,022	-0,053
	p	0,830	0,605
Fragmentación	Coef. correlación	0,117	0,118
	p	0,258	0,257
Simetría	Coef. correlación	0,029	0,050
	p	0,777	0,627

**Tabla 34.** Correlaciones de Spearman de los parámetros embrionarios analizados en D+3 y el porcentaje medio de espermatozoides positivos para el AT2R y el PRR. p: significación bilateral.

Correlaciones de Spearman de parámetros embrionarios de la cohorte embrionaria en D+3 de desarrollo					
		tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Nº células	Coef. correlación	0,078	-0,140	0,105	-0,190
	p	0,486	0,211	0,351	0,089
Fragmentación	Coef. correlación	-0,241*	0,064	0,047	0,090
	p	0,033	0,574	0,684	0,431
Simetría	Coef. correlación	-0,117	-0,160	0,244*	0,020
	p	0,296	0,152	0,028	0,859

**Tabla 35.** Correlaciones de Spearman de los parámetros embrionarios analizados en D+3 con porcentajes de espermatozoides positivos para tACE y APN y los valores medios de moléculas de tACE y APN por espermatozoide de las muestras seminales. p: significación bilateral. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Relación del desarrollo embrionario avanzado con el AT2R, el PRR, la tACE y la APN

#### 3.4.1. Embriones en D+5 de desarrollo

##### 3.4.1.1. Estadio de desarrollo

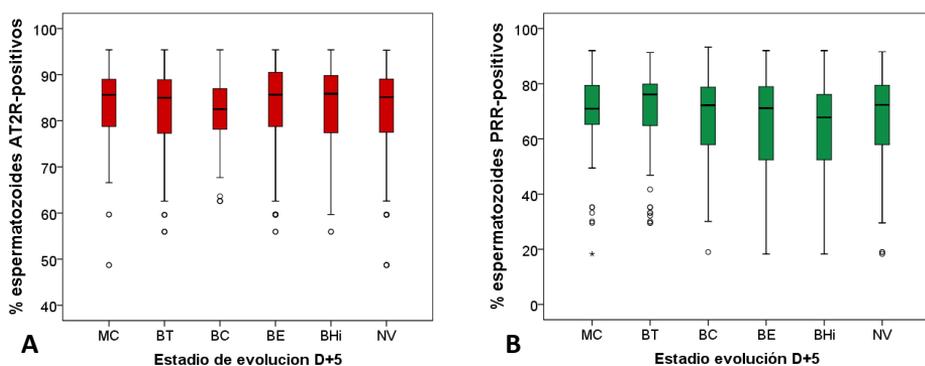
Se analizó si tanto los receptores AT2R y PRR, como las enzimas tACE y APN presentes en los espermatozoides, tenían alguna relación con la evolución de los embriones en las fases avanzadas del cultivo *in vitro*. Para ello, estos componentes del RAS se relacionaron con los distintos grupos de embriones en D+5 de desarrollo clasificados en función de su estadio de evolución (Figuras 33 y 34). En la tabla 36 se muestran los valores de las medianas, el número de embriones clasificados en cada uno de los grupos, así como la significación obtenida mediante el test de Kruskal Wallis, para cada componente del RAS analizado en los espermatozoides.

Se observó que únicamente existían diferencias significativas entre los distintos estadios de evolución en D+5 al analizar la **media de moléculas de tACE** por espermatozoide y ( $p < 0,05$ ). Los tests de U de Mann-Whitney determinaron que estas diferencias se encontraban entre los embriones clasificados como BHi y los clasificados como BT y BC (ambos  $p < 0,05$ ); y los bloqueados o degenerados (NV) con los BE y los BHi ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente) (Figura 34B).

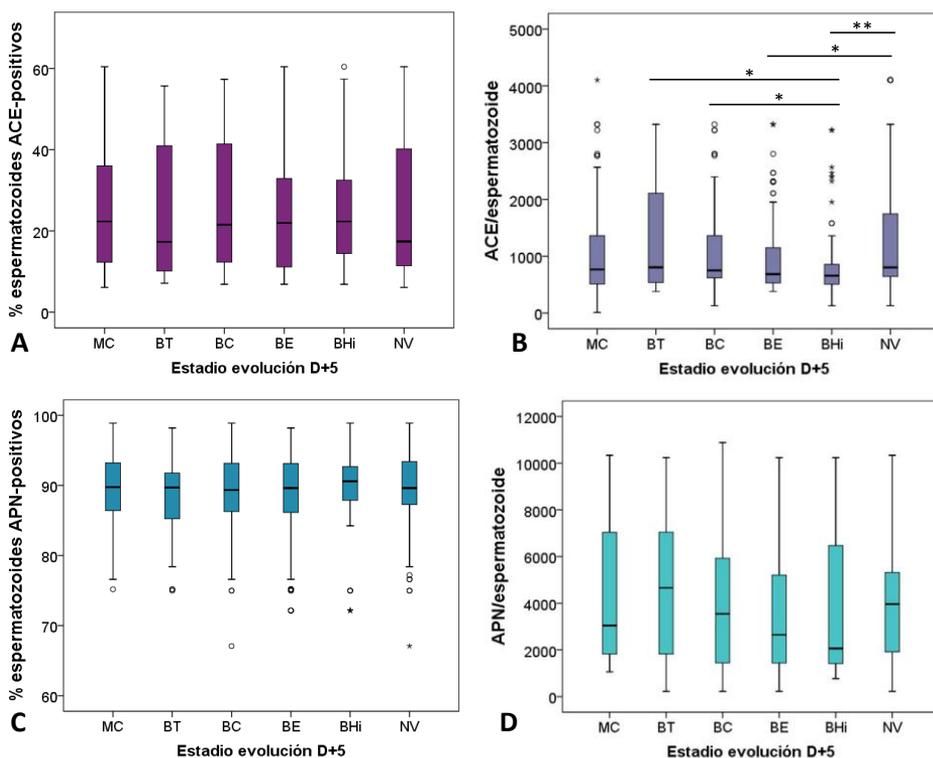
Estadio del desarrollo en D+5						
Estadio evolución	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
MC	85,65 (91)	70,97 (95)	22,34 (87)	768 (87)	89,75 (86)	3043 (86)
BT	85,00 (78)	76,10 (73)	17,31 (66)	804 (66)	89,70 (65)	4659 (65)
BC	82,56 (78)	72,23 (96)	21,54 (74)	749 (74)	89,35 (76)	3547 (76)
BE	85,67(160)	71,17 (150)	21,95 (124)	685 (124)	89,62 (119)	2648 (119)
BHi	85,87(112)	67,79 (87)	22,34 (81)	656 (81)	90,59 (67)	2063 (67)
NV	85,14 (183)	72,35 (150)	17,41 (134)	803 (134)	89,62 (113)	3963 (113)
<b>p (KW)</b>	0,391	0,651	0,401	0,027*	0,768	0,121

**Tabla 36.** Valores de las medianas de cada elemento del RAS estudiado en los espermatozoides, de las agrupaciones de embriones en D+5 según el estadio de evolución en el que se encontraban los embriones en D+5 de desarrollo. MC: mórula compacta; BT: blastocisto temprano; BC: blastocisto cavitado o en expansión; BE: blastocisto expandido; BHi: blastocisto en fase de hatching; y NV: embriones bloqueados o degenerados. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de Kruskal Wallis. \* diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## Resultados



**Figura 33.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en función del estadio de evolución en el que se encontraban los embriones en D+5 de desarrollo. MC: mórula compacta; BT: blastocisto temprano; BC: blastocisto cavitado o en expansión; BE: blastocisto expandido; BHi: blastocisto en fase de hutching; y NV: embriones bloqueados o degenerados. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 34.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide en función del estadio de evolución en el que se encontraban los embriones en D+5 de desarrollo. MC: mórula compacta; BT: blastocisto temprano; BC: blastocisto cavitado o en expansión; BE: blastocisto expandido; BHi: blastocisto en fase de hutching; y NV: embriones bloqueados o degenerados. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

### 3.4.1.2. Viabilidad del blastocistos

Para el análisis de este parámetro únicamente se tuvieron en cuenta los embriones que habían alcanzado el estadio de blastocisto. Éstos se dividieron en dos grupos: 1) blastocistos viables y 2) blastocistos no viables. Se consideraron como blastocistos viables aquellos que fueron transferidos o criopreservados, y como no viables aquellos que se habían bloqueado, degenerado o que no habían alcanzado una calidad o estadio de desarrollo adecuados. En la tabla 37 se detallan los valores de las medianas, el número de embriones clasificados como viables o no viables, así como la significación obtenida mediante el test de U de Mann-Whitney para cada componente del RAS analizado en los espermatozoides.

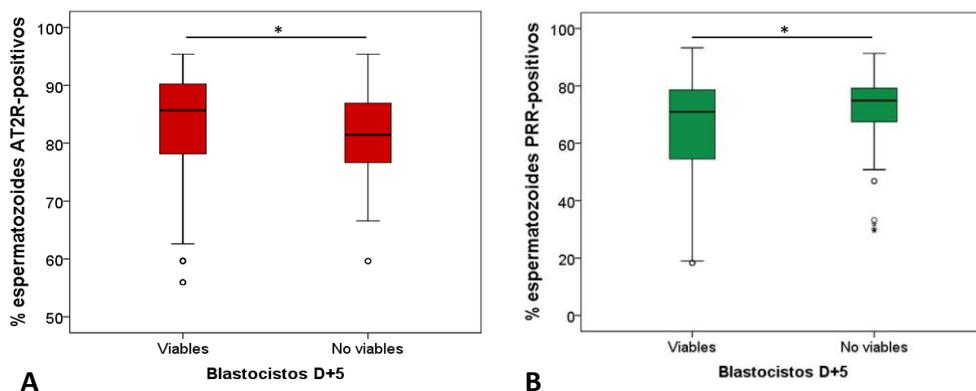
Se puede ver cómo al analizar los porcentajes de espermatozoide positivos tanto para el **AT2R** (Figura 35A), como para el **PRR** (Figura 35B), se observaban diferencias entre los grupos de blastocistos considerandos viables y los no viables, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Estos datos indican que en D+5, las muestras seminales que presentan un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R se relacionan con los blastocistos viables. Mientras que las muestras seminales con un menor porcentaje de espermatozoides positivos para el PRR tienden a generar blastocistos viables.

Por otra parte, al estudiar la **media de moléculas de APN** por espermatozoide también se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de blastocistos ( $p < 0,05$ ) (Tabla 37). Así, las muestras seminales que generan blastocistos viables presentan espermatozoides con un menor número de moléculas de APN en su superficie (Figura 36D).

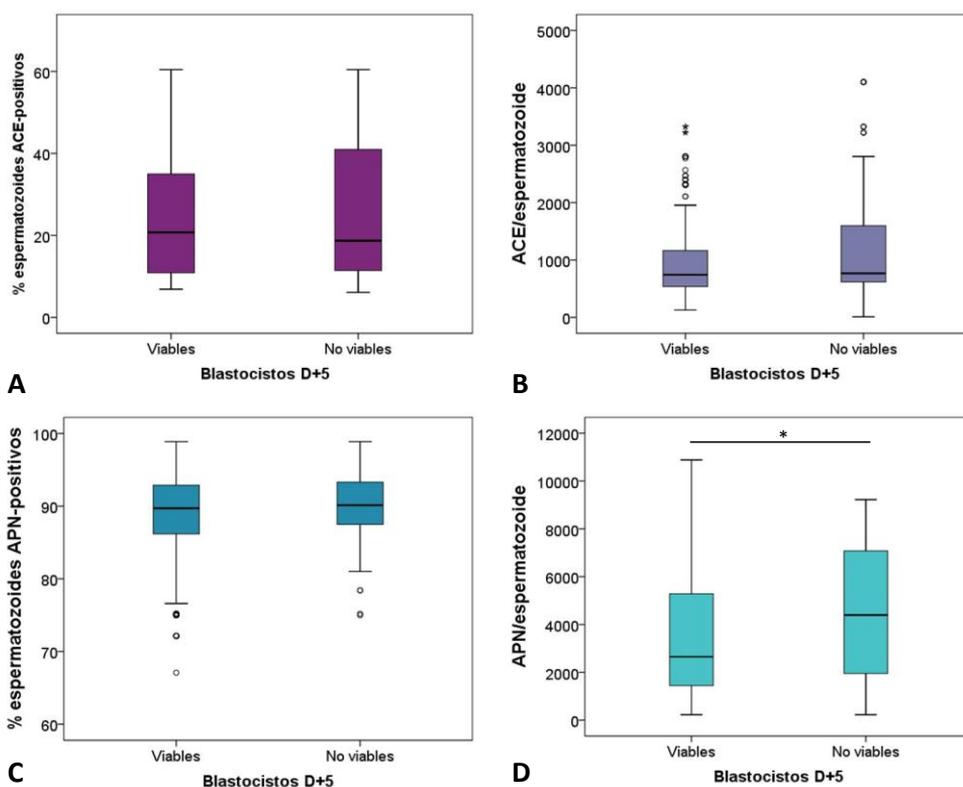
Viabilidad de los blastocistos en D+5						
Viabilidad	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Viables	85,67 (363)	70,94 (350)	20,73 (309)	742 (309)	89,70 (275)	2648 (275)
No Viables	81,45 (65)	74,91 (56)	18,70 (57)	768 (57)	90,13 (52)	4393 (52)
<b>p (KW)</b>	0,037*	0,028*	0,800	0,051	0,964	0,019*

**Tabla 37.** Valores de las medianas de los blastocistos considerados como viables o no viables en D+5 de desarrollo, para cada elemento del RAS estudiado en los espermatozoides. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de Kruskal Wallis. \* diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

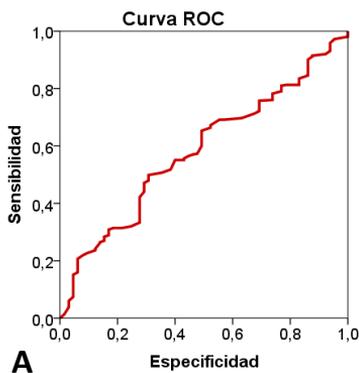


**Figura 35.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en función de la viabilidad de los blastocistos en D+5 de desarrollo. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).



**Figura 36.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide en función de la viabilidad de los blastocistos en D+5 de desarrollo. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

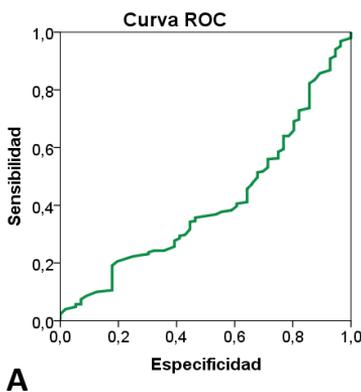
Teniendo en cuenta estos resultados y su relevancia a nivel clínico, se decidió examinar si el porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R, el PRR o el valor medio de moléculas de APN por espermatozoide, podrían servir como parámetros predictivos para la determinación de la viabilidad de los blastocistos en D+5 de desarrollo. Para ello se realizaron análisis mediante curvas ROC. Sin embargo, estos análisis mostraron que ni el AT2R (Figura 37), ni el PRR (Figura 38), y ni la APN (Figura 39), poseían valor predictivo para discernir de una forma objetiva entre los blastocistos viables y no viables.



Análisis de la curva ROC	
AUC <sup>ROC</sup>	0,581
Significación	0,036
Valor umbral	-
Sensibilidad (%)	-
Especificidad (%)	-

AUC<sup>ROC</sup>: Área bajo la curva

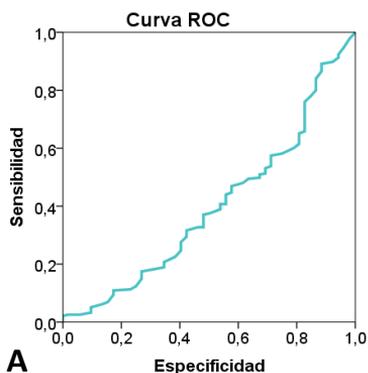
**Figura 37. A)** Imagen de la curva ROC del porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R y la viabilidad de los blastocistos en D+6. **B)** Datos de área bajo la curva, significación, valor umbral, sensibilidad y especificidad obtenidos de este análisis.



Análisis de la curva ROC	
AUC <sup>ROC</sup>	0,490
Significación	0,039
Valor umbral	-
Sensibilidad (%)	-
Especificidad (%)	-

AUC<sup>ROC</sup>: Área bajo la curva

**Figura 38. A)** Imagen de la curva ROC del porcentaje de espermatozoides positivos para el PRR y la viabilidad de los blastocistos en D+6. **B)** Datos de área bajo la curva, significación, valor umbral, sensibilidad y especificidad obtenidos de este análisis.



Análisis de la curva ROC	
AUC <sup>ROC</sup>	0,398
Significación	0,044
Valor umbral	-
Sensibilidad (%)	-
Especificidad (%)	-

AUC<sup>ROC</sup>: Área bajo la curva

**Figura 39. A)** Imagen de la curva ROC del valor medio del número de moléculas de APN por espermatozoide y la viabilidad de los blastocistos en D+5. **B)** Datos de área bajo la curva, significación, valor umbral, sensibilidad y especificidad obtenidos de este análisis.

### 3.4.2. Embriones en día 6 de desarrollo

#### 3.4.2.1. Estadio de desarrollo

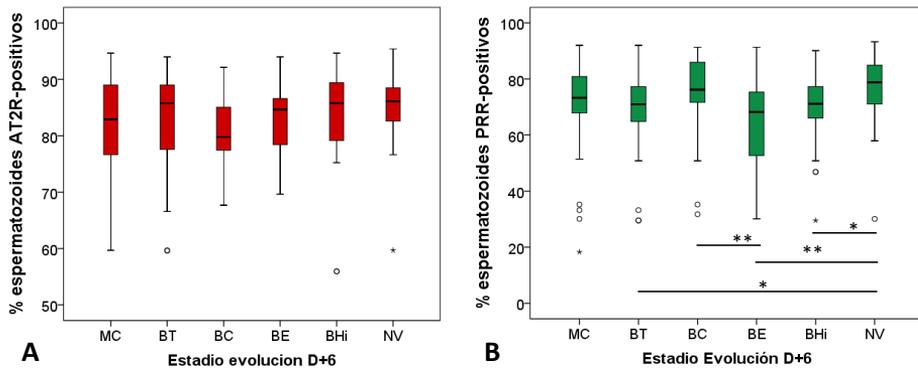
De igual forma que se hizo para D+5, también se analizó si tanto los receptores AT2R y PRR, como las enzimas tACE y APN presentes en los espermatozoides, tenían alguna relación con la evolución de los embriones. Para lo cual, estos componentes del RAS se relacionaron con los distintos grupos de estadios de evolución en los que se encontraban los embriones en D+6 de desarrollo. En la tabla 38 se encuentran detallados los valores de las medianas de cada uno de los estadios de desarrollo, el número de embriones clasificados en cada uno de estos grupos, así como la significación obtenida mediante el test de Kruskal Wallis para cada uno de los elementos del RAS analizados en los espermatozoides.

Como se muestra en la tabla 38, se hallaron diferencias significativas entre los distintos estadios de evolución ( $p < 0,01$ ), al analizar el porcentaje de espermatozoides positivos para el **PRR**. Los tests de U de Mann-Whitney determinaron que concretamente, estas diferencias se encontraban entre los embriones clasificados como BC y los BE ( $p < 0,01$ ), y entre los NV y los clasificados como BT, BE y BHi ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) (Figura 40B).

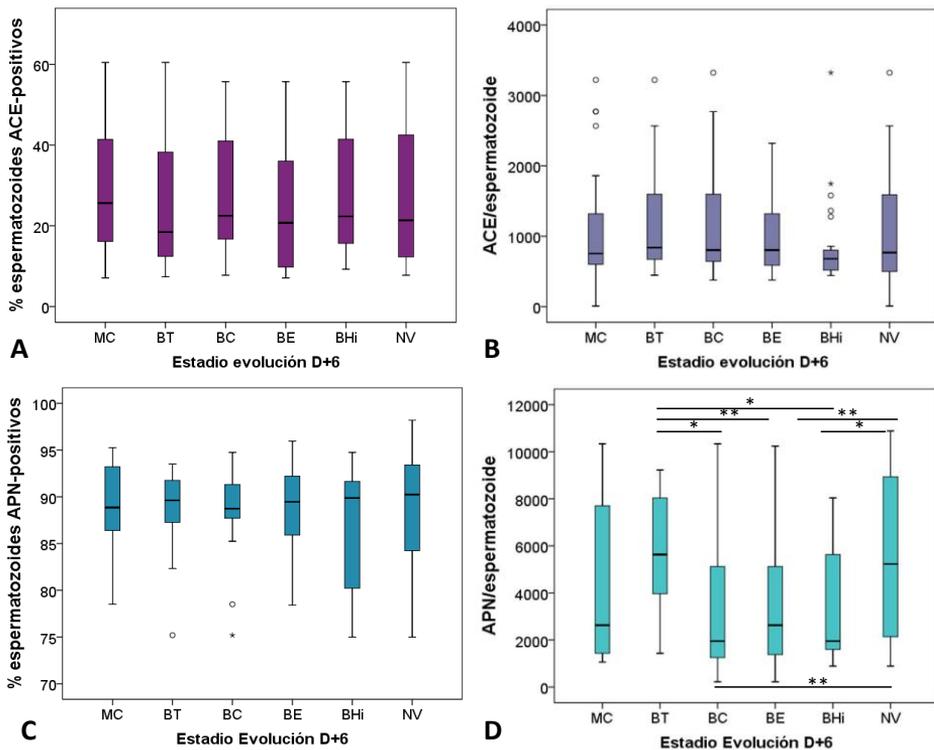
Por otra parte, también se hallaron diferencias significativas entre la **media de moléculas de APN** por espermatozoide de los distintos estadios de evolución en D+5 ( $p < 0,01$ ) (Tabla 38). Los tests de U de Mann-Whitney determinaron que estas diferencias se daban entre los embriones clasificados como BT y los clasificados como BC, BE y BHi ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente), y entre los NV y los BC, los BE y los BHi ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) (Figura 41D). Es decir, que las muestras seminales que presentan un mayor número de moléculas de APN generan blastocistos con un desarrollado más lento o no viables (bloqueados o degenerados). Mientras que las muestras seminales que presentan un menor número de moléculas de APN generan blastocistos clasificados como BC, BE y BHi.

Estadio del desarrollo en D+6						
Estadio evolución	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
MC	82,92 (30)	73,29 (33)	25,64 (36)	755 (36)	88,85 (30)	2630 (30)
BT	85,76 (33)	70,97 (21)	18,45 (21)	838 (21)	89,62 (17)	5629 (17)
BC	79,78 (27)	76,18 (30)	22,49 (29)	804 (29)	88,73 (25)	1951 (25)
BE	84,65 (52)	68,25 (48)	20,73 (43)	804 (43)	89,47 (42)	2630 (42)
BHi	85,77 (28)	71,17 (27)	22,34 (23)	680 (23)	89,87 (15)	1950 (15)
NV	86,13 (16)	78,81 (31)	21,35 (23)	768 (23)	90,24 (37)	5232 (37)
p (KW)	0,207	0,002**	0,611	0,451	0,983	0,005**

**Tabla 38.** Valores de las medianas de las agrupaciones de embriones en D+5 según el estadio de evolución en el que se encontraban los embriones en D+6 de desarrollo, para cada elemento del RAS estudiado en los espermatozoides. MC: mórula compacta; BT: blastocisto temprano; BC: blastocisto cavitado o en expansión; BE: blastocisto expandido; BHi: blastocisto en fase de hatching; y NV: embriones bloqueados o degenerados. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de Kruskal Wallis. \* diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\* diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).



**Figura 40.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en función del estadio de evolución en el que se encontraban los embriones en D+6 de desarrollo. MC: mórula compacta; BT: blastocisto temprano; BC: blastocisto cavitado o en expansión; BE: blastocisto expandido; BHi: blastocisto en fase de hutching; y NV: embriones bloqueados o degenerados. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).



**Figura 41.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide en función del estadio de evolución en el que se encontraban los embriones en D+6 de desarrollo. MC: mórula compacta; BT: blastocisto temprano; BC: blastocisto cavitado o en expansión; BE: blastocisto expandido; BHi: blastocisto en fase de hutching; y NV: embriones bloqueados o degenerados. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

**3.4.2.2. Viabilidad de los blastocistos**

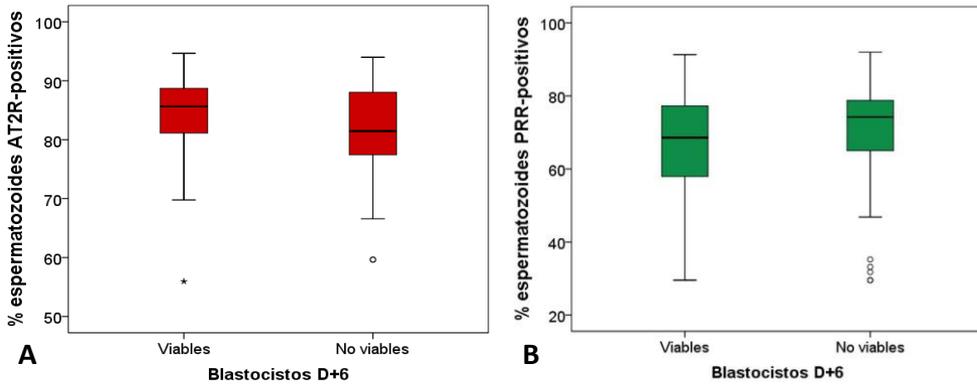
Al igual que con los embriones en D+5, se compararon los distintos componentes del RAS analizados en los espermatozoides con los blastocistos viables y no viables en D+6 de desarrollo. Estos datos junto con el número de blastocistos clasificados como viables o no viables (entre paréntesis), y la significación obtenida mediante el test de U de Mann-Whitney se presentan en la tabla 39.

Tal y como se muestra en la tabla 39, se vieron diferencias estadísticamente significativas al analizar los **valores medios de moléculas de APN por espermatozoide** con respecto a la viabilidad de los blastocistos en D+6 ( $p < 0,05$ ) (Figura 43D). Al igual que sucede en D+5, los espermatozoides que tienden a generar blastocistos viables presentan un menor número de moléculas de APN en su superficie.

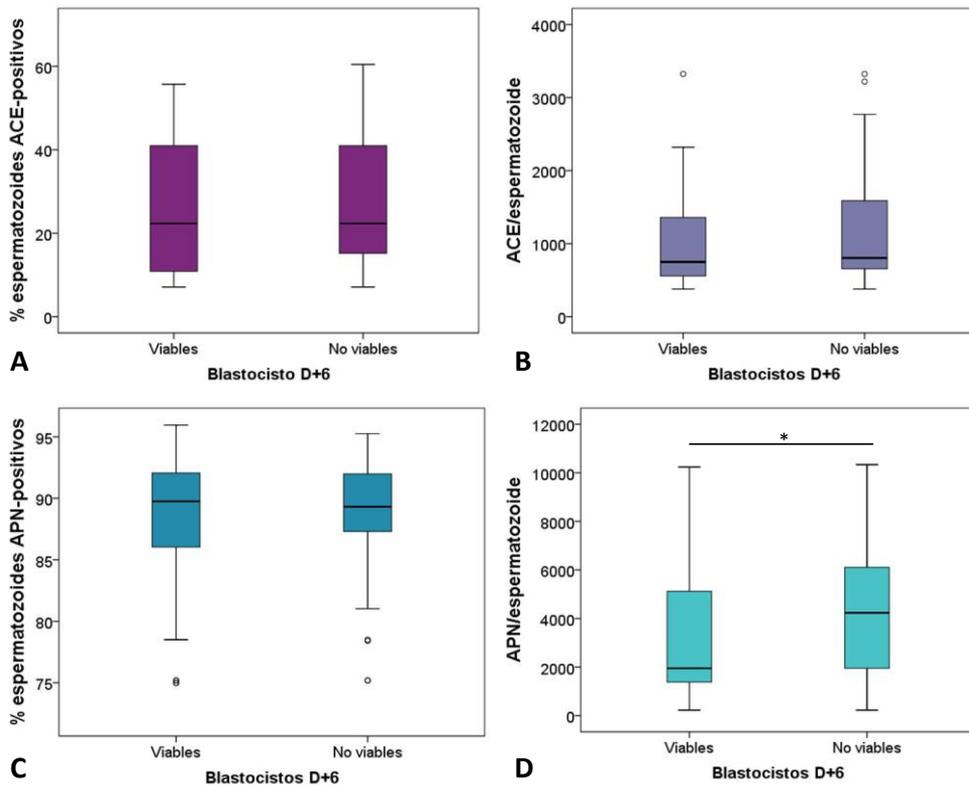
En cuanto al **AT2R** (Figura 42A), aunque no existía una diferencia estadísticamente significativa, entre el porcentaje de espermatozoides positivos para el **AT2R** y la viabilidad de los blastocistos, el valor obtenido estaba muy cerca de la significación estadística (Tabla 39). Observándose, al igual que en D+5, que las muestras seminales que presentan un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para este receptor se asocian con blastocistos viables.

Viabilidad de los blastocistos en D+6						
Viabilidad	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Viables	85,65 (68)	68,59 (66)	22,34 (61)	749 (61)	89,75 (52)	1950 (52)
No Viables	81,45 (72)	74,25 (60)	22,34 (55)	768 (55)	89,31 (47)	4235 (47)
<b>p (KW)</b>	0,062	0,253	0,927	0,272	0,947	0,029*

**Tabla 39.** Valores de las medianas de los blastocistos considerados como viables o no viables en D+6 de desarrollo, para cada elemento del RAS estudiado en los espermatozoides. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de Kruskal Wallis. \* diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



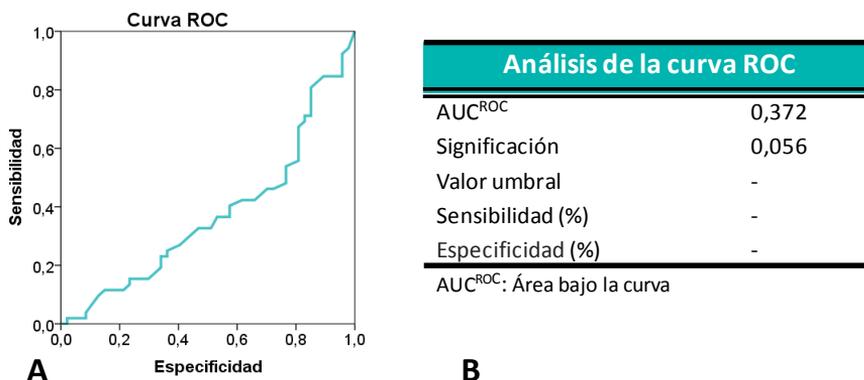
**Figura 42.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en función de la viabilidad de los blastocistos en D+6 de desarrollo.



**Figura 43.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide en función de la viabilidad de los blastocistos en D+5 de desarrollo. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en relación a la APN y la viabilidad de los blastocistos, se decidió examinar si los valores medios de esta enzima por espermatozoide podrían tener valor predictivo para determinar la viabilidad de los embriones en este estadio del desarrollo. Para ello, se realizó un análisis mediante la curva ROC. Sin embargo, tal y como se muestra en la figura 44, este análisis mostró que la media de moléculas de APN por espermatozoide no poseía valor predictivo como test clínico para discernir de una forma objetiva entre los blastocistos viables y no viables.



**Figura 44.** A) Imagen de la curva ROC del valor medio del número de moléculas de APN por espermatozoide y la viabilidad de los blastocistos en D+6. B) Datos de área bajo la curva, significación, valor umbral, sensibilidad y especificidad obtenidos de este análisis.

### 3.4.3. Destino final del embrión

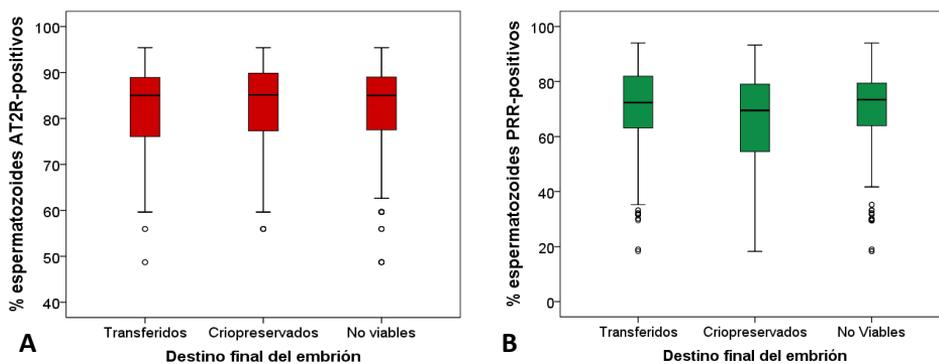
El último de los análisis en cuanto a la calidad embrionaria hace referencia al destino final del embrión. Los embriones podían tener 3 destinos: ser transferidos, criopreservados (para su posterior transferencia embrionaria en caso de ser necesarios) o ser no viables, y por lo tanto, descartados. En la tabla 40, se especifican los datos de las medianas de los diferentes grupos junto con el número de embriones clasificados en función de su destino final (entre paréntesis), y la significación obtenida del test mediante el de Kruskal Wallis para cada elemento del RAS analizado en los espermatozoides.

Como se observa en la tabla 40, sólo se vieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de embriones con distinto destino final ( $p < 0,001$ ) al analizar la **media de moléculas de APN** por espermatozoide (Figura 46D). Los tests de U de Mann-Whitney, demostraron que estas diferencias se debían a las existentes entre los embriones descartados (no viables) y los embriones transferidos y criopreservados ( $p < 0,05$  y  $P < 0,001$ , respectivamente). Así, los espermatozoides que presentan un menor número de moléculas de APN se asocian con embriones que van a ser transferidos o criopreservados.

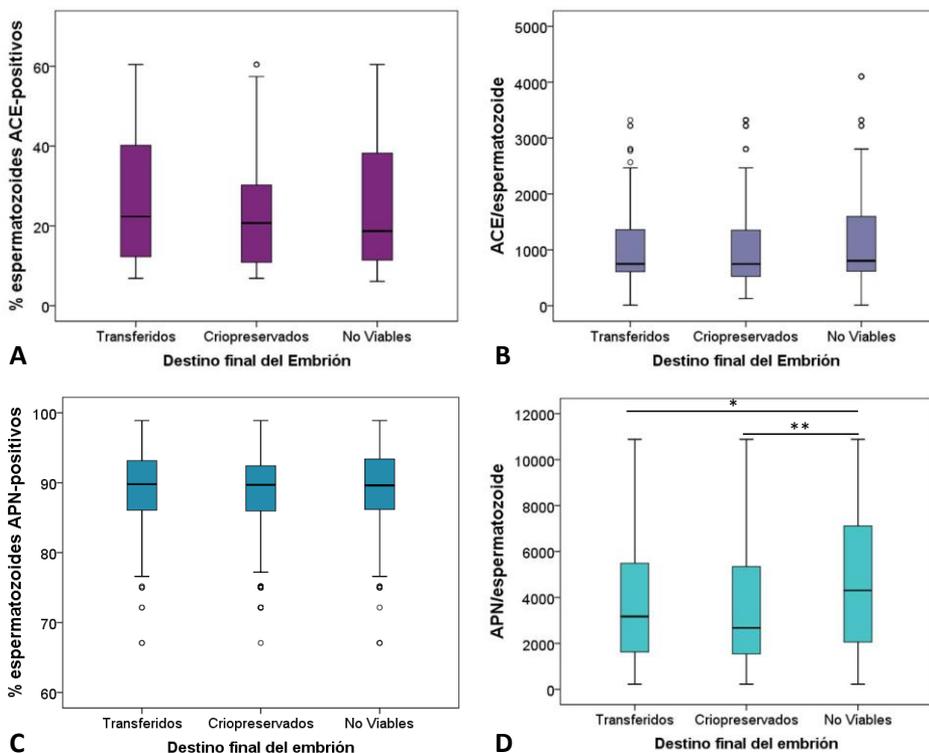
Destino final del embrión						
Destino	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Transferidos	85,00 (147)	72,35 (142)	22,84 (118)	748 (118)	89,79 (112)	3170 (112)
Criopreservados	85,14 (314)	69,48 (257)	20,73 (210)	746 (210)	89,70 (202)	2674 (202)
No Viables	85,00 (364)	73,41 (356)	18,70 (307)	804 (307)	89,62 (297)	4305 (297)
<b>p (KW)</b>	0,620	0,087	0,416	0,152	0,625	0,000**

**Tabla 40.** Valores de las medianas de las distintas agrupaciones en función del destino final del embrión para cada elemento de RAS estudiado. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de Kruskal Wallis. \*\* diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

## Resultados



**Figura 45.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en los grupos de distintos destinos embrionarios: transferidos, criopreservados o no viables.



**Figura 46.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la TACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** TACE y **D)** APN por espermatozoide en los grupos de distintos destinos embrionarios: transferidos, criopreservados o no viables. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

### **3.5. Resumen de los resultados del tercer objetivo**

#### **3.5.1. AT2R**

Tras el análisis de los resultados se puede ver como el AT2R está asociado con algunos parámetros embrionarios. Así, el uso de una muestra seminal con un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R se asocia con una mayor tasa de fecundación mediante la técnica de FIV. Por otra parte, también se asocia con la calidad, desarrollo y viabilidad de los embriones. Así, la presencia de un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R en las muestras espermáticas, por un lado se asocia con una por calidad embrionaria en D+2 y D+3, y además, esta correlacionado con un mayor porcentaje de fragmentación en la cohorte embrionaria en D+2. Por otro lado, las muestras seminales que presentan un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para este receptor, se asocian con embriones con mayor viabilidad en D+5.

#### **3.5.2. PRR**

En cuanto al PRR, se ha visto que está asociado con los parámetros de evolución y viabilidad embrionaria. De esta forma, la presencia de un menor porcentaje de espermatozoides positivos para el PRR en las muestras espermáticas se relaciona con una mayor viabilidad en D+5 de desarrollo, y con embriones con mayor desarrollo embrionario en D+6.

#### **3.5.3. tACE**

En relación a la tACE, se ha visto que está asociado con los parámetros de calidad y desarrollo embrionario. Así, la presencia de un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para la tACE en las muestras seminales, está relacionado con una mejor calidad de los embriones tempranos, D+2 y D+3. Donde además, en D+3 también se correlaciona con un menor porcentaje de fragmentación de la cohorte embrionaria. Finalmente, un menor número de moléculas de tACE por espermatozoide en dichas muestras espermáticas, se asocia con embriones con un mayor grado de evolución de los embriones en D+6 de desarrollo.

#### **3.5.4. APN**

Finalmente, al estudiar la relación de la APN con los parámetros embrionarios se vio que la presencia de un menor número de moléculas de APN por

espermatozoide en las muestras espermáticas, se relaciona con embriones de mejor calidad en D+2 y D+3 de desarrollo. De igual forma, en D+3 de desarrollo embrionario, la presencia de un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima se asocia con una mayor asimetría embrionaria. En cuanto al desarrollo embrionario más avanzado, en D+5 y D+6, se ha observado como la APN se asocia al desarrollo, viabilidad y destino final del embrión. Así, las muestras seminales que contienen un menor número de moléculas de APN por espermatozoide se asocian con embriones en estadios evolutivos más avanzados en D+6 de y embriones con una mayor viabilidad tanto en D+5 como en D+6, y también con embriones que van a ser transferidos o criopreservados.

#### 4. Relación del AT2R, PRR, la tACE y la APN con los resultados de las TRA

Finalmente, en este último objetivo, se analizaron los resultados de los 173 ciclos incluidos en este estudio. Los datos descriptivos de los resultados de las TRA de la totalidad de las muestras y de los distintos conjuntos de muestras utilizados para medir cada uno de los componentes del RAS estudiados, están representados en la tabla 30. El **porcentaje de casos con transferencia** hace referencia al número de casos en los que se ha transferido algún embrión respecto al número total de casos analizados. La **tasa de embarazo bioquímico** describe el porcentaje de resultados de pruebas bioquímicas de embarazo positivas respecto al número de transferencias embrionarias. Por su parte, la **tasa de implantación** representa el porcentaje de sacos gestacionales observados en ecografía respecto al número de embriones transferidos. Y finalmente, la **tasa de gestación clínica** hace referencia al porcentaje de embarazos con saco gestacional observado en ecografía respecto al número de casos en los que se ha producido transferencia embrionaria.

Resultados de las TRA					
	Total	AT2R	PRR	tACE	APN
Casos con transferencia (%)	93,64	94,84	91,75	93,83	90,12
Tasa de embarazo bioquímico (%)	72,84	73,91	70,79	71,05	71,23
Tasa de implantación (%)	57,77	64,62	53,19	51,69	49,55
Tasa de gestación clínica (%)	66,67	71,74	62,92	60,53	60,27

**Tabla 41.** Valores de los resultados de las TRA. Se muestra el porcentaje del total de los casos y de los datos correspondientes a cada uno de los grupos de casos analizados en cada elemento del RAS estudiado en los espermatozoides.

Previamente, se analizó el tipo de distribución que seguían los datos de cada uno de los conjuntos de muestras mediante un test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (cuando el tamaño muestral era superior a 50) o de Shapiro-Wilk (cuando el tamaño muestral fue menor de 50). Estos tests determinaron que los distintos grupos de muestras no seguían una distribución normal ( $p < 0,01$ ).

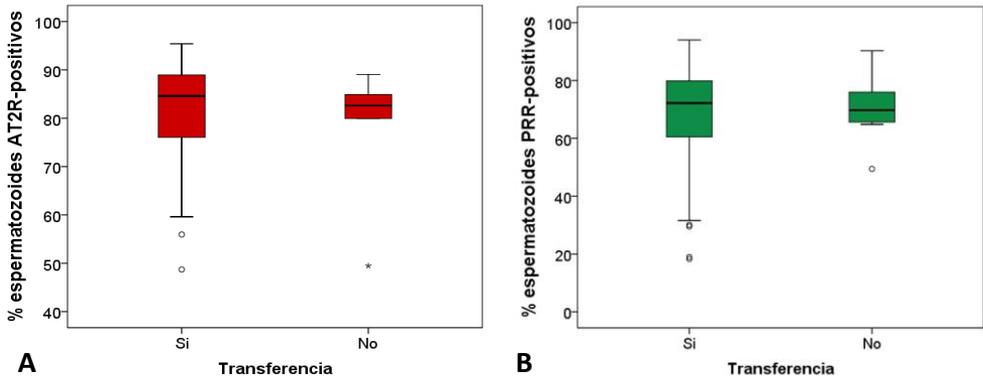
### 4.1. Transferencia

De los 173 casos analizados en esta tesis, en 162 se produjo la transferencia de al menos un embrión. Sin embargo, en 11 casos no se obtuvieron embriones o éstos no presentaban la calidad suficiente como para ser transferidos al útero materno. De forma que se quiso estudiar si existía alguna relación entre los receptores o las enzimas del RAS con respecto a si se había producido o no transferencia embrionaria. Los valores de las medianas, el tamaño muestral de cada uno de los grupos, así como la significación obtenida en el test estadístico de U de Mann-Whitney se muestran en la tabla 42.

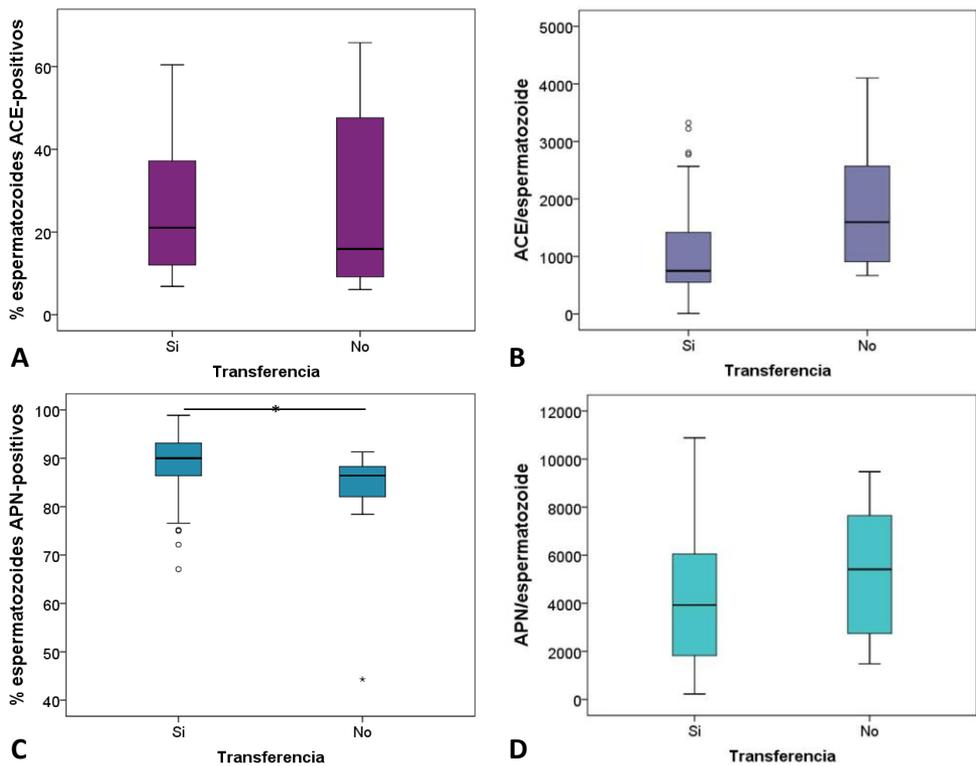
Se observaron diferencias estadísticamente significativas al analizar el porcentaje de espermatozoide positivos para **APN** con respecto a si se había producido transferencia embrionaria o no ( $p < 0,01$ ) (Figura 48C). Lo que indica, que los casos en los que se producen transferencias embrionarias se asocian con muestras seminales con un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para APN. Sin embargo, no se observó ninguna otra relación entre los demás elementos del RAS analizados y si se había producido o no la transferencia embrionaria (Figuras 47 y 48).

Transferencia						
Transferencia	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Si	84,58 (92)	72,23 (66)	21,04 (76)	749 (76)	90,01 (73)	3923 (73)
No	82,61 (5)	69,71 (60)	15,88 (5)	1597 (5)	86,42 (8)	5417 (8)
p (UMW)	0,493	0,704	0,814	0,074	0,025*	0,282

**Tabla 42.** Valores de las medianas de los casos en los que hubo o no transferencia embrionaria, para cada elemento del RAS estudiado en los espermatozoides. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de U de Mann-Whitney.



**Figura 47.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en función de si se ha realizado la transferencia embrionaria o no.



**Figura 48.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide en función de si se ha realizado la transferencia embrionaria o no. \*diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ).

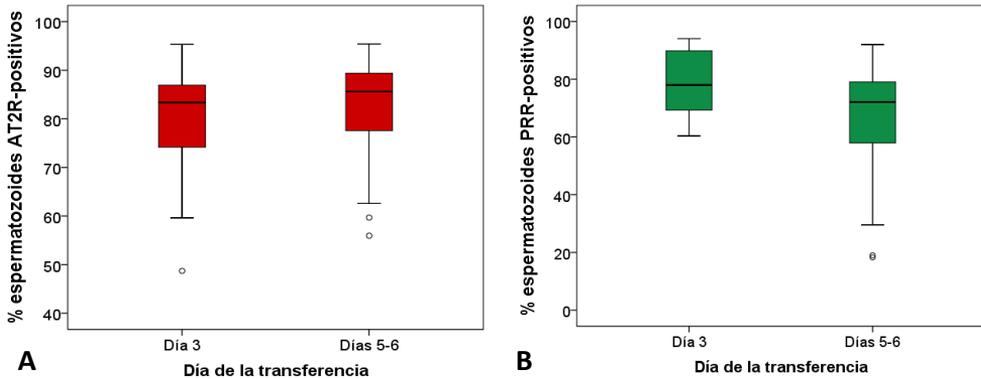
## 4.2. Transferencia en D+3 vs D+5-D+6

A continuación, se analizaron tanto los receptores como las enzimas del RAS estudiados en esta tesis, con respecto al día en el que se habían realizado las transferencias. De igual forma, los valores de las medianas de los componentes del RAS analizados, el número de muestras incluidas en cada uno de los grupos, así como la significación obtenida en el test estadístico de U de Mann-Whitney se muestra en la tabla 43. No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa dependiendo del día en que se realizó la transferencia (Figuras 49 y 50).

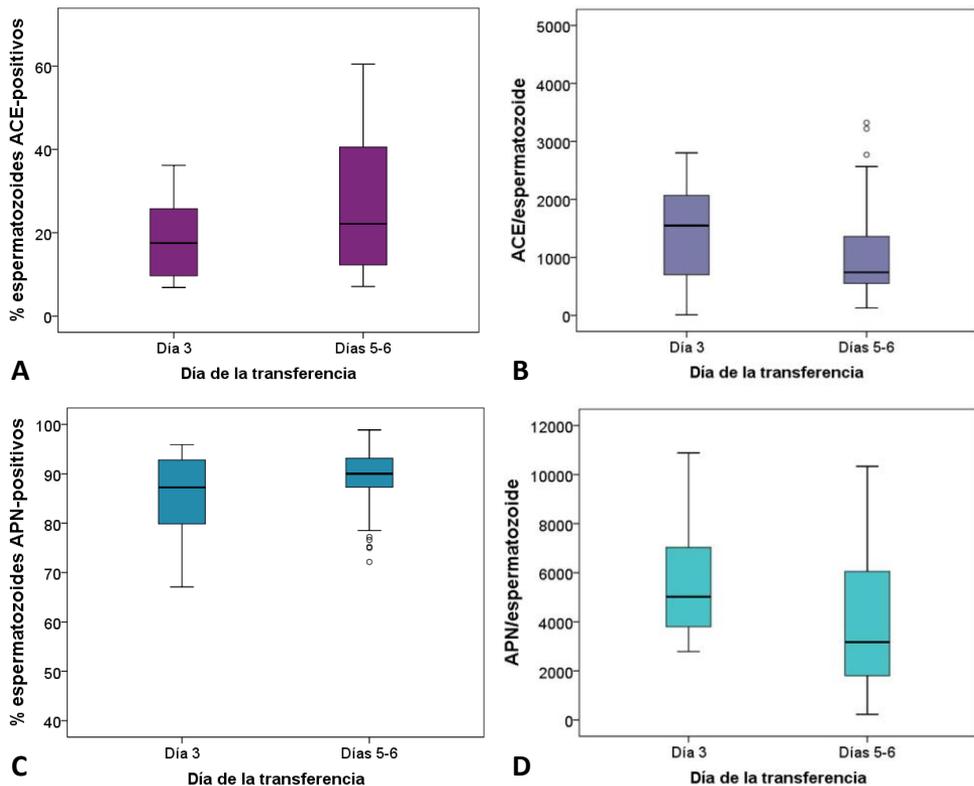
No obstante, aunque no llegó a obtener una significación estadística, si que se observó que la diferencia entre el porcentaje de espermatozoides positivos para el PRR en los distintos días en los que se realizaron las trasferencias estaba muy cerca de ser significativa (Figura 49B). Mostrando que las muestras seminales con mayor porcentaje de espermatozoides positivos para este receptor tienden a generar embriones que son transferidos en estadios de desarrollo embrionario temprano.

Día de la transferencia						
Transferencia	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
D+3	83,36 (26)	77,97 (11)	17,52 (8)	1549 (8)	87,24 (8)	5021 (8)
D+5 – D+6	85,62 (66)	72,07 (78)	22,14 (68)	743(68)	90,01 (65)	3170 (65)
p (UMW)	0,120	0,052	0,181	0,257	0,392	0,072

**Tabla 43.** Valores de las medianas de los casos en los que la transferencia embrionaria fue realizada en D+3 y en D+5-D+6, para cada elemento del RAS estudiado en los espermatozoides. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de U de Mann-Whitney.



**Figura 49.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en función del día en el que se ha realizado la transferencia embrionaria. Día 3: transferencia en D+3 de desarrollo embrionario; Días 5-6: transferencia de blastocistos en D+5 ó D+6 de desarrollo embrionario.



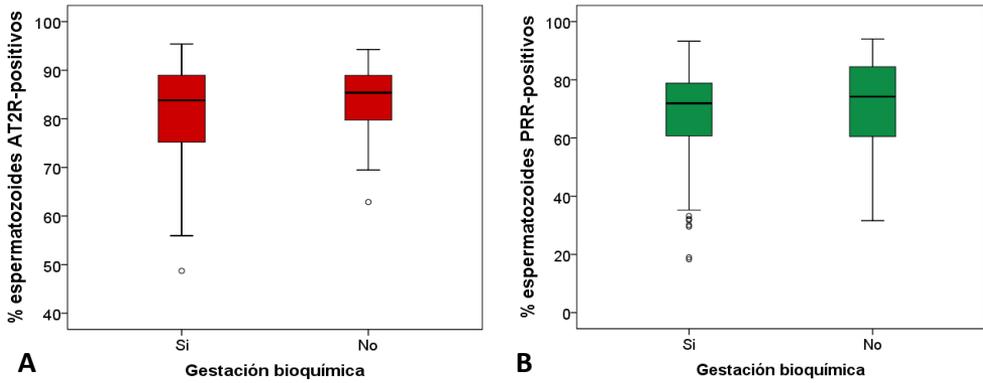
**Figura 50.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide en función del día en el que se ha realizado la transferencia embrionaria. Día 3: transferencia en D+3 de desarrollo embrionario; Días 5-6: transferencia de blastocistos en D+5 ó D+6 de desarrollo embrionario.

### 4.3. Embarazo bioquímico

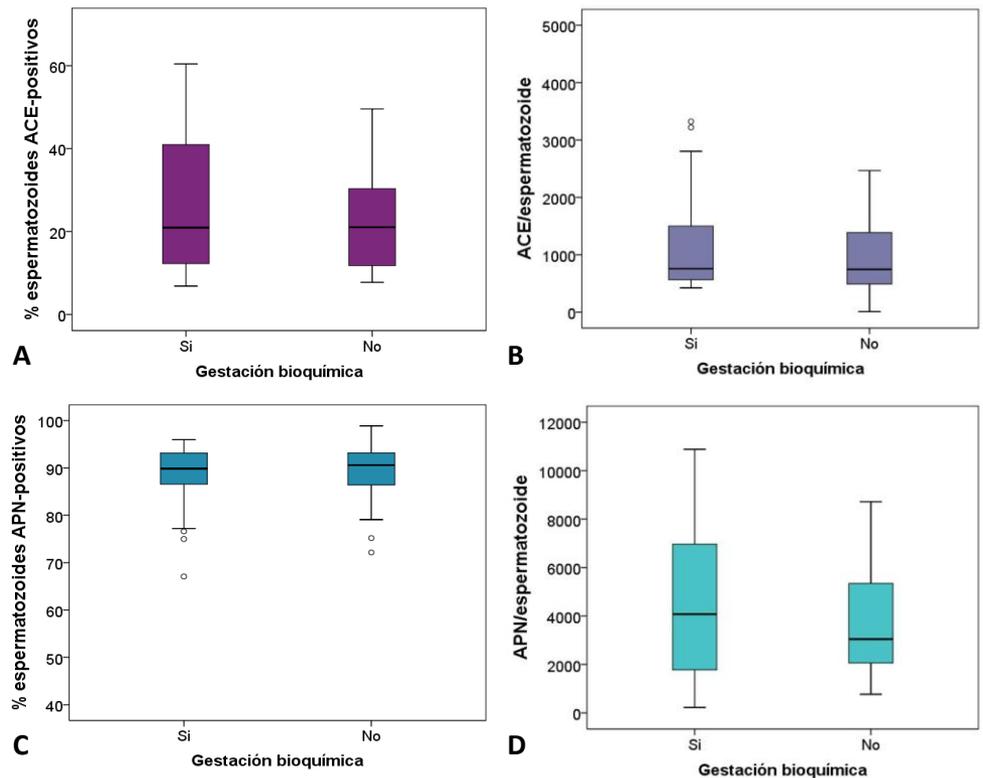
Posteriormente, se analizó si existía alguna asociación entre de los receptores o las enzimas del RAS, y el resultado de la prueba de determinación sérica de  $\beta$ hCG. La evaluación en sangre de los niveles de esta hormona constituye una prueba de embarazo bioquímica. En la tabla 44, se detallan los valores de las medianas de los distintos componentes del RAS analizados, el número de embriones clasificados en función de resultado de la prueba de embarazo, así como la significación obtenida mediante el test de U de Mann-Whitney. Como se puede observar, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa (Figuras 51 y 52).

Embarazo bioquímico						
Embarazo BQ	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Si	83,83 (68)	71,93 (63)	20,95 (54)	758 (54)	89,85 (52)	4074 (52)
No	85,39 (24)	74,22 (26)	21,04 (22)	746(22)	90,59 (21)	3043 (21)
p (UMW)	0,542	0,427	0,571	0,610	0,841	0,679

**Tabla 44.** Valores de las medianas de los casos en los que la determinación sérica de  $\beta$ -hCG fue positiva y negativa, para cada elemento del RAS estudiado en los espermatozoides. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de U de Mann-Whitney.



**Figura 51.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en función del resultado de la prueba de embarazo mediante la determinación sérica de la hormona  $\beta$ hCG. Si: resultado positivo; No: resultado negativo o no embarazo.



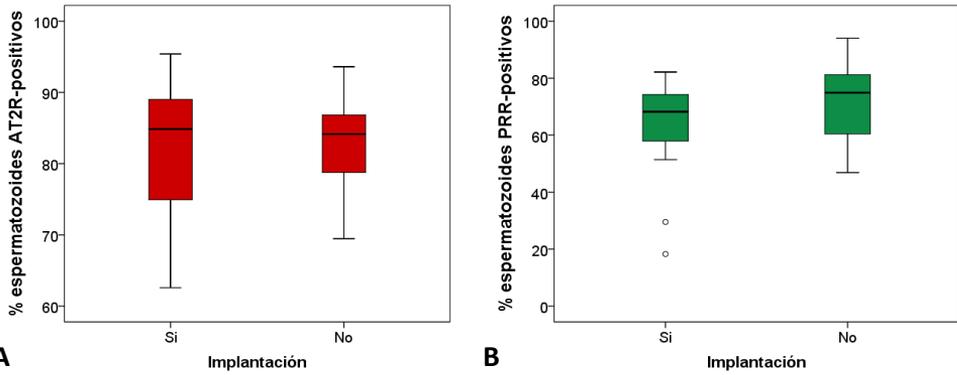
**Figura 52.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide en función del resultado de la prueba de embarazo mediante la determinación sérica de la hormona  $\beta$ hCG. Si: resultado positivo; No: resultado negativo o no embarazo.

#### 4.4. Implantación

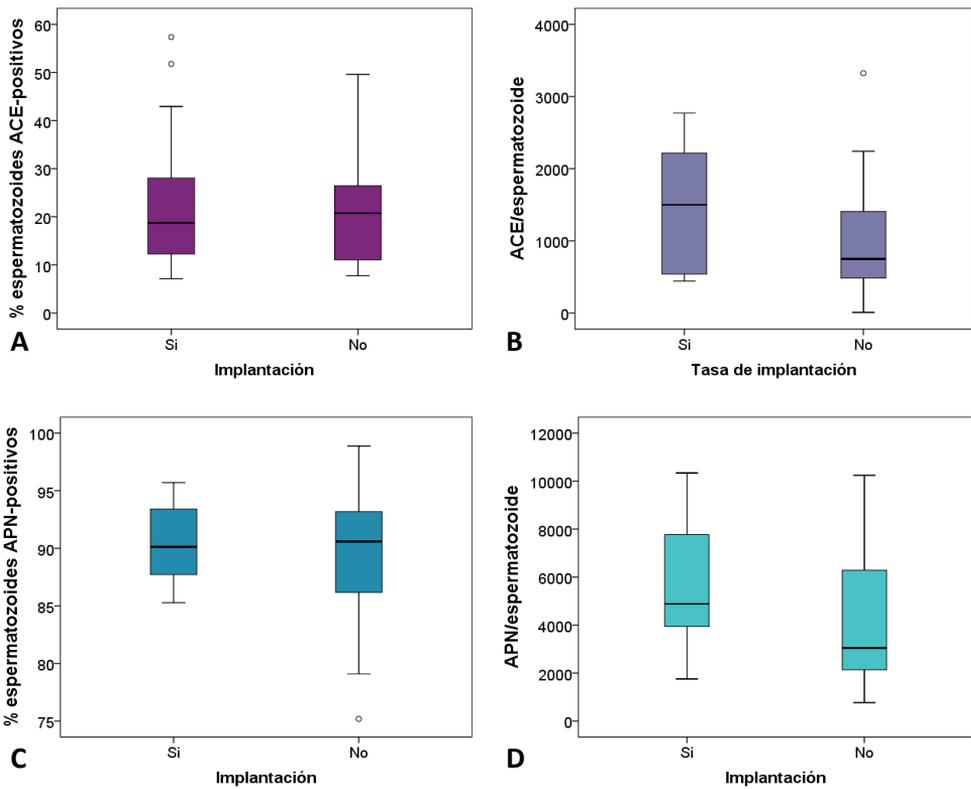
Seguidamente, se analizó si existía alguna relación entre los receptores o las enzimas del RAS estudiadas y la implantación de los embriones transferidos. Debido a la creciente tendencia a transferir un único embrión para evitar embarazos múltiples, en el análisis de esta variable sólo se consideraron los casos en los que se transfirió un único embrión. De forma que se consideró que el embrión había implantado cuando se observó un saco gestacional con latido cardiaco, y por tanto implantación; mientras que se consideró que no se había producido implantación cuando no se observó saco gestacional. En la tabla 45 se especifican los valores de las medianas y el número de embriones clasificados en cada uno de los grupos según si hubo implantación, así como la significación obtenida mediante el test de U de Mann-Whitney para cada uno de los elementos del RAS analizados en los espermatozoides. Como se puede observar, no se halló ninguna diferencia estadísticamente significativa (Figuras 53 y 54).

Implantación embrionaria						
Implantación	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Si	84,86 (20)	68,23 (18)	18,70 (15)	1500(15)	90,13 (18)	4883 (18)
No	84,16 (17)	74,91 (19)	20,73 (19)	749 (19)	90,59 (17)	3043 (17)
p (UMW)	0,903	0,153	0,986	0,231	0,792	0,235

**Tabla 45.** Valores de las medianas de los casos en los que se ha producido la implantación tras la transferencia embrionaria y en los que no, para cada elemento del RAS estudiado en los espermatozoides. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de U de Mann-Whitney.



**Figura 53.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en función del resultado de si se ha producido la implantación (si se ha observado saco gestacional con latido cardiaco).



**Figura 54.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide en función del resultado de si se ha producido la implantación.

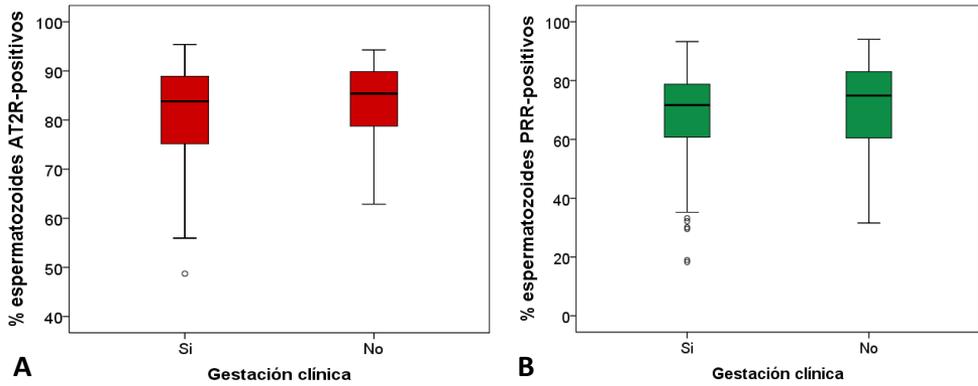
### 4.5. Gestación clínica

Finalmente, el último parámetro analizado en este cuarto objetivo fue la gestación clínica. Al igual que en los apartados anteriores, se estudió si existía algún tipo de relación entre los receptores o las enzimas del RAS analizadas en los espermatozoides, y la consecución o no de una gestación clínica. Se consideró que existía una gestación clínica cuando se visualizó mediante ecografía el saco gestacional con latido cardiaco. En la tabla 46 están representados los valores de las medianas, el número de embriones clasificados en cada uno de los grupos en función de si hay o no gestación clínica, así como la significación obtenida mediante el test de U de Mann-Whitney de cada uno de los elementos del RAS analizados en los espermatozoides.

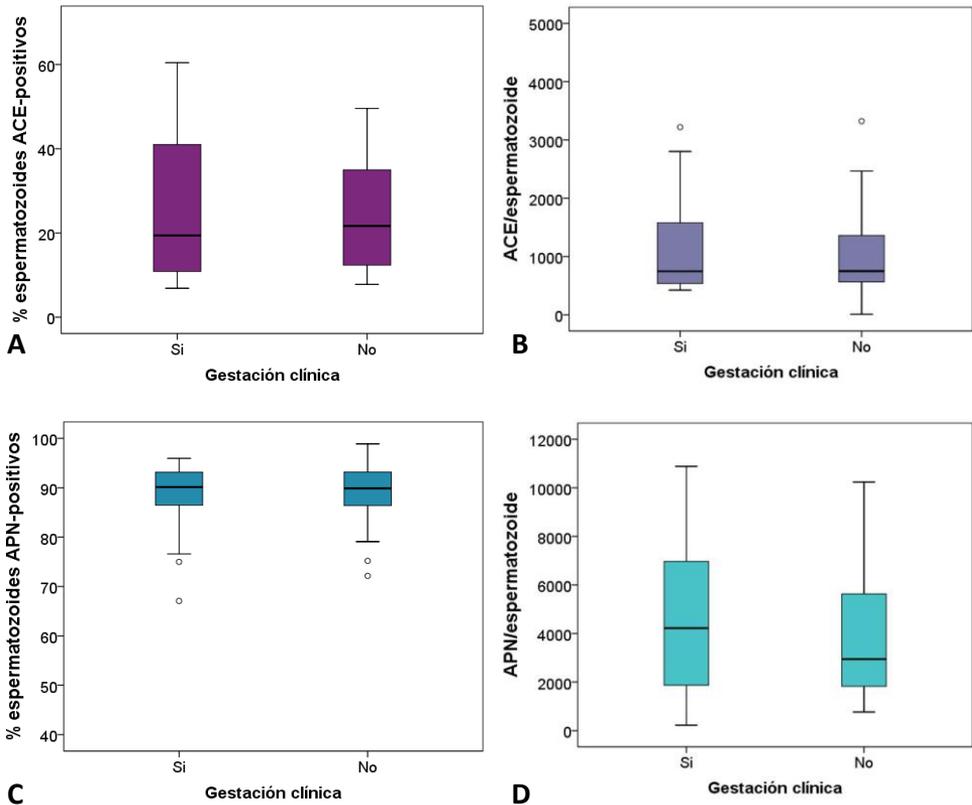
Tras estos análisis se evidenció, que no existían diferencias significativas entre los grupos que terminaron en una gestación clínica y los que no (Figuras 55 y 56).

Gestación clínica						
Gestación clínica	AT2R	PRR	tACE	tACE/spz	APN	APN/spz
Si	83,83 (66)	71,69 (56)	19,40 (46)	746 (46)	90,12 (44)	4221 (44)
No	85,39 (26)	74,91 (33)	21,65 (30)	749(30)	89,87 (29)	2941 (29)
p (UMW)	0,480	0,386	0,869	0,962	0,822	0,411

**Tabla 46.** Valores de las medianas de los casos en los que hay o no gestación clínica para cada elemento del RAS estudiado en los espermatozoides. Entre paréntesis se especifica el número de muestras incluidas en cada grupo. p: significación bilateral resultante del test de U de Mann-Whitney.



**Figura 55.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** el AT2R y **B)** el PRR en función de si hay o no gestación clínica. Si: se ha conseguido gestación clínica; No: no se ha producido gestación clínica.



**Figura 56.** Porcentajes de espermatozoides positivos para **A)** la tACE y **B)** la APN y los valores medios de moléculas de **C)** tACE y **D)** APN por espermatozoide, en función de si hay o no gestación clínica. Si: se ha conseguido gestación clínica; No: no se ha producido gestación clínica.

### **4.6. Resumen de los resultados del cuarto objetivo**

Tras el análisis de todos los datos referentes a los resultados de las TRA, se puede determinar que los casos en los que se ha producido transferencia embrionaria, independientemente del número de embriones transferidos, provienen de muestras seminales que presentan unos porcentajes más elevados de espermatozoides positivos para la APN, que los casos en los que no se ha realizado la transferencia embrionaria.

Mientras que el resto de parámetros analizados referentes a los resultados de los tratamientos de fecundación *in vitro*, no mantienen ninguna asociación con los elementos del RAS estudiados en los espermatozoides.





## **V. DISCUSIÓN**



La infertilidad se ha convertido en un problema médico y social de gran importancia mundial, que actualmente afecta a un 15% de las parejas en edad reproductiva (Mascarenhas *et al.*, 2012; ESHRE, 2014). Por lo que el desarrollo de las TRA supuso un hito en el tratamiento de estos problemas al aumentar las posibilidades de éxito reproductivo (Khorram *et al.*, 2001; Chemes y Álvarez Sedo, 2012). Hoy día, el análisis del semen constituye la única herramienta diagnóstica y pronóstica para evaluar el estatus fértil del varón. Sin embargo, presenta una serie de limitaciones, sobre todo en los casos de infertilidad de origen desconocido (Guzick *et al.*, 2001; Lewis, 2007; Garrido *et al.*, 2008). En estos casos, 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 TRA (Samplaski *et al.*, 2010). El RAS es un sistema molecular que ha sido descrito en los gametos masculinos humanos, en los que actúa sobre distintas funciones fisiológicas (Vinson *et al.*, 1997). En este sentido, el RAS está implicado en la regulación de la fertilidad masculina operando a múltiples niveles (Leung y Sernia, 2003; Paul *et al.*, 2006). El objetivo de esta tesis se ha centrado en aumentar el conocimiento del papel del RAS en la fisiología espermática, así como en determinar su posible relación con los parámetros seminales y embrionarios, y con los resultados de las TRA.

## 1. AT2R

La Ang II ha sido descrita como el principal péptido bioactivo del RAS (De Gasparo *et al.*, 1999), estando implicada tanto en la función, como en el potencial fecundante de los espermatozoides (Vinson *et al.*, 1996; Gur *et al.*, 1998; Sabeur *et al.*, 2000). Por una parte, la exposición de las células espermáticas a Ang II aumenta el porcentaje de espermatozoides móviles, así como su movilidad lineal progresiva (Vinson *et al.*, 1997). Mientras que por otra parte, este péptido ha sido relacionado con los procesos de capacitación y reacción acrosómica (Vinson *et al.*, 1996; Gur *et al.*, 1998; Sabeur *et al.*, 2000). Concretamente, la Ang II ejerce su acción a través de su unión a los receptores AT1R y AT2R (De Gasparo *et al.*, 1999; Herr *et al.*, 2013) que han sido localizados en diferentes partes del aparato reproductor masculino (Vinson *et al.*, 1997; Leung *et al.*, 1997; Speth *et al.*, 1999). El AT1R ha sido descrito en las células germinales masculinas en desarrollo

y en los espermatozoides maduros (Vinson *et al.*, 1995a; Vinson *et al.*, 1995b), localizándose en el flagelo de los gametos masculinos humanos (Vinson *et al.*, 1995a). Sin embargo, a pesar de que el AT2R ha sido descrito en los espermatozoides de ratón (Wennemuth *et al.*, 1999) y de que se ha sugerido su presencia en los espermatozoides humanos (Kohn *et al.*, 1998a), no hay ninguna evidencia directa que demuestre su presencia en estos últimos, así como sus posibles funciones. En este estudio se demuestra por primera vez la presencia del AT2R en los espermatozoides humanos, así como su implicación en la fisiología de los mismos.

### 1.1. Descripción del AT2R en los espermatozoides humanos

En primer lugar, se ha descrito la presencia del transcrito del AT2R en los espermatozoides humanos. Considerando que el espermatozoide maduro es una célula transcripcionalmente inactiva (Miller y Ostermeier, 2006a), es probable que este transcrito fuera expresado durante la espermatogénesis. Este hecho se sustenta en los resultados de diversos estudios que describen la presencia de un pool de RNAs en espermatozoides, cuya síntesis tuvo lugar durante las primeras etapas de la espermatogénesis y que posteriormente, en la espermiogénesis, fueron selectivamente retenidos y protegidos de su degradación (Ostermeier *et al.*, 2005; Lalancette *et al.*, 2008; Jodar *et al.*, 2016). Aunque se desconoce la función exacta que desempeñan estos RNAs, se les han atribuido numerosas acciones como: 1) ayudar en la compactación de la cromatina, 2) participar en la impronta génica, 3) ser traducidos a proteínas por los polisomas mitocondriales, 4) activar al cigoto durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario y 5) conferir el patrón espacial al embrión temprano (Miller y Ostermeier, 2006a; Miller y Ostermeier, 2006b; Lalancette *et al.*, 2008; Goto *et al.*, 2010). En este sentido, el transcrito del AT2R presente en los espermatozoides podría haber sido retenido selectivamente en el espermatozoide para participar en alguno de estos procesos, o para ser traducido a proteínas esenciales para la fecundación, como ha sido observado en otros transcritos espermáticos (Ostermeier *et al.*, 2004; Chalbi *et al.*, 2014; Jodar *et al.*, 2016).

Por otra parte, también se ha demostrado la presencia de la proteína del AT2R en espermatozoides humanos. Mediante western blot se detectaron dos bandas de diferentes pesos moleculares, 53 KDa y 56 KDa en los gametos masculinos

humanos, mientras que en el tejido renal humano únicamente se detectó una banda de 50 KDa. Esta banda de 50 KDa hallada en el control positivo, concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos realizados tanto en células renales humanas, como en otros tipos celulares de origen humano (Jurewicz *et al.*, 2007; Dolley-Hitze *et al.*, 2010), confirmando de esta forma, la especificidad de las bandas. Por otra parte, diversos estudios demuestran que en las muestras espermáticas no resulta inusual obtener bandas de diferentes pesos moleculares a las halladas en otros tipos celulares (Naz y Sellamuthu, 2006). Aún así, serían necesarios posteriores estudios que estudiaran la posible existencia de isoformas específicas testiculares del AT2R.

Posteriormente, la presencia del AT2R en los espermatozoides humanos fue confirmada mediante citometría de flujo e inmunocitoquímica. En concreto se determinó la presencia del AT2R aproximadamente en un 80% de los espermatozoides, siendo este porcentaje similar en ambas técnicas. En cuanto a la localización del AT2R en los espermatozoides, se observó un intenso marcaje en el segmento ecuatorial/postacrosomal de la cabeza espermática. Este tipo de marcaje es distinto al observado en ratones, donde el AT2R se localiza en la región acrosomal de la cabeza espermática (Wennemuth *et al.*, 1999). Estos distintos patrones de inmunomarcaje también han sido descritos en otras proteínas, mostrando una localización específica de especie (Rago *et al.*, 2014). Esta localización en el segmento ecuatorial/postacrosomal de la cabeza espermática coincide con la de otros componentes de distintos sistemas de señalización molecular. Como por ejemplo, el receptor  $\mu$ -opioide (MOR) (Agirregoitia *et al.*, 2006), la pro-encefalina (PENK) (Subirán *et al.*, 2012), el receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (Solakidi *et al.*, 2005), o el receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Calogero *et al.*, 1999), y de otras proteínas presentes en la cabeza del espermatozoide como el receptor del factor de crecimiento similar a insulina (IGFI) (Henricks *et al.*, 1998), las cuales están implicadas en la regulación de funciones esenciales en los espermatozoides, como la movilidad espermática o el proceso de fecundación (Solakidi *et al.*, 2005). Lo que sugiere que el AT2R podría estar implicado en alguno de estos procesos.

En resumen, este trabajo describe por primera vez la presencia del AT2R en los espermatozoides humanos tanto a nivel génico, como proteico. Además, el AT2R se encuentra expresado en un elevado porcentaje de los gametos masculinos, en

los que se localiza principalmente en la región ecuatorial/postacrosomal de la cabeza espermática.

### **1.2. Relación con los parámetros seminales**

Uno de los primeros objetivos planteados fue analizar los porcentajes de espermatozoides que presentaban el AT2R en su superficie para determinar si mantiene alguna relación con los parámetros seminales básicos (volumen, concentración y movilidad). Estos análisis tenían el propósito de evaluar su posible uso como biomarcador espermático de calidad seminal.

Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R se correlaciona positiva y significativamente con la movilidad progresiva de las muestras seminales, tanto en fresco como tras ser procesadas. De manera, también se vio una correlación negativa significativa con el porcentaje de espermatozoides inmóviles de las muestras en fresco y procesadas. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores, que observaron que sus ligandos endógenos, Ang I y II, producen un aumento del porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva, al igual que aumentan la movilidad progresiva lineal (Vinson *et al.*, 1995b; Vinson *et al.*, 1996).

Además, se ha observado una correlación positiva significativa entre el porcentaje de células que expresan este receptor con la concentración y el volumen de las muestras procesadas. Estas correlaciones podrían deberse a la forma de procesar las muestras seminales para usar en la ICSI. Ya que a la hora de seleccionar y coger un único espermatozoide para microinyectar es preferible trabajar con concentraciones diluidas de espermatozoides (Matorras y Hernandez, 2007). En este sentido, para conseguir que la muestra esté menos concentrada se aumenta el volumen del medio en el que se resuspenden los espermatozoides recuperados. Esto supone que cuanto mejores son las muestras en fresco, tras su recuperación estas van a tener un mayor volumen y/o concentración espermática. Lo que concuerda con las correlaciones positivas que se observan con la concentración de las muestras en fresco y procesadas.

Con el objetivo de determinar el posible valor del AT2R como marcador diagnóstico o pronóstico de patologías seminales, también se analizó su relación con las distintas etiologías seminales descritas por la OMS (OMS, 2010). Al analizar el porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R y las diferentes patologías seminales, se observó que los varones astenozoospermicos presentaban un menor porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R que los varones normozoospermicos, y que los teratozoospermicos. Estos resultados concuerdan con el hecho de que el receptor se encuentre positivamente relacionado con la movilidad, ya que la astenozoospermia se define como una patología seminal debida a un bajo porcentaje de espermatozoides móviles en el eyaculado. Lo que hace que esta patología sea una de las principales causas de infertilidad, ya a que los espermatozoides inmóviles son incapaces de alcanzar al oocito y penetrar en él con normalidad (Chemes y Álvarez Sedo, 2012). Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos en los que se observó que la expresión del AT2R puede verse alterada en determinadas condiciones patológicas (Iwai y Horiuchi, 2009). No obstante, el bajo número de casos incluidos en los grupos de pacientes astenozoospermicos y oligozoospermicos, probablemente debido a los criterios de inclusión, puede resultar un factor limitante a la hora de hallar diferencias más significativas. Teniendo en cuenta estas observaciones, serían necesarios posteriores estudios que incluyeran un mayor número de casos que permitiesen comprobar la magnitud de estas observaciones encontradas.

Tras observar que los porcentajes de espermatozoides que presentan el AT2R en su membrana son inferiores en los pacientes astenozoospermicos en comparación con los normozoospermicos, se creyó que esta proteína podía ser un factor determinante en la movilidad espermática. Razón por la cual, se procedió a evaluar si el AT2R poseía valor predictivo para diferenciar de forma objetiva, muestras astenozoospermicas de normozoospermicas. El análisis de la curva ROC mostró que efectivamente, este receptor tiene valor predictivo para diferenciar las muestras con estas etiologías. Así, las muestras con un porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R superior al 72,51%, tendrían una sensibilidad del 95,6%, es decir, de diferenciar muestras seminales de pacientes normozoospermicos, y una especificidad del 75%, es decir de diferenciar muestras de pacientes astenozoospermicos. A pesar de ello, su aplicación en la práctica clínica diaria resultaría muy limitada, ya que para alcanzar el mismo

resultado resulta más rápido, sencillo y económico realizar un análisis seminal tradicional (Garrido *et al.*, 2008).

En resumen, los resultados obtenidos muestran que el AT2R se relaciona con distintos parámetros seminales como la concentración y el volumen, aunque principalmente se encuentra implicado en la regulación de la movilidad espermática. Además se detectó una menor expresión del AT2R en pacientes astenozoospermicos en comparación con los normozoospermicos presentando valor predictivo para diferenciar las muestras con estas etiologías. Estos resultados sugieren que el AT2R puede ser considerado como un potencial biomarcador de movilidad espermática, y una herramienta útil para predecir el estatus fértil del varón.

### **1.3. Relación con los parámetros embrionarios**

En este apartado se quiso evaluar una posible influencia del AT2R espermático en las tasas de fecundación así como en el desarrollo embrionario. Para ello, se analizó si el porcentaje de espermatozoides que presentaban el AT2R en su superficie mantenía alguna relación con las tasas de fecundación oocitaria, con alguno de los parámetros que se examinan de forma rutinaria en la determinación de la calidad embrionaria de los embriones tempranos (D+2 y D+3), de los embriones en fases más avanzadas del cultivo *in vitro* (D+5 y D+6), o con el destino final de los embriones.

#### **1.3.1. Fecundación del oocito**

Las características moleculares del espermatozoide juegan un papel fundamental en el proceso de fecundación, lo que supone que no todos los oocitos maduros resultan ser fecundados (Chan *et al.*, 1993; Barroso *et al.*, 2009; Govindaraju *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta esto, el siguiente objetivo fue evaluar el posible uso del AT2R como biomarcador espermático predictivo de la capacidad fecundante.

En el presente estudio se observó que el porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R se correlaciona positiva y significativamente con las tasas de fecundación obtenidas en la técnica de FIV. Esto es consistente con el hecho

de que el AT2R esté implicado en la movilidad espermática, ya que diversos trabajos avalan como el uso en las TRA de espermatozoides con buena movilidad, mejora las tasas de fecundación (Bhilawadikar *et al.*, 2013). Por otra parte, el hecho de que no se vea ninguna relación con las tasas de fecundación obtenidas tras la técnica de la ICSI, ratifica que una buena movilidad es importante para la fecundación mediante la técnica de FIV. A pesar de este resultado, el bajo número de casos en los que se llevado a cabo esta técnica puede resultar un factor limitante a la hora de hallar diferencias más significativas. Aunque se considera necesaria la realización de futuros experimentos que corroboren estos datos, los resultados obtenidos en este estudio indican que el AT2R podría ser usado como biomarcador de selección para el éxito en las tasas de fecundación mediante la técnica de FIV.

### **1.3.2. Desarrollo embrionario temprano**

Hoy en día se sabe que tanto el AT2R, como la Ang II participan en los procesos de desarrollo embrionario (Tebbs *et al.*, 1999; Pijacka *et al.*, 2012). Por otra parte, el AT2R está implicado en la movilidad, y el uso en las TRA de espermatozoides con buena movilidad, mejora la calidad embrionaria (Bhilawadikar *et al.*, 2013). Debido a ello, en este apartado se ha analizado si el porcentaje de espermatozoides que presentan el AT2R influye en los indicadores morfológicos y morfocinéticos embrionarios, con el objetivo de evaluar su posible uso como biomarcador espermático pronóstico o diagnóstico de la calidad embrionaria.

De forma rutinaria, en los laboratorios de embriología humana se trabaja con una serie de variables que proporcionan información del estado y de la evolución de los embriones, así como de su potencial de implantación (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015). En D+2 y D+3 de desarrollo, en la asignación de la calidad embrionaria se tienen en cuenta una serie de parámetros morfocinéticos entre los que destacan el número de células y ritmo de división embrionaria, la fragmentación, y la simetría o desigualdad del tamaño de los blastómeros. El sistema de gradación embrionaria propuesto por ASEBIR establece un sistema de 4 categorías (A, B, C o D), divididas en función del potencial implantatorio esperado (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015). Considerándose como embriones de buena calidad los correspondientes a las calidades A y B, los embriones de calidad subóptima los clasificados con calidad C, y los de mala calidad los

pertenecientes a la categoría D (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Esta clasificación supone que, la calidad embrionaria es un indicador predictivo del éxito del tratamiento.

En el presente estudio, el porcentaje de embriones de buena calidad en D+2 se sitúa en torno al 73,69%, para descender en D+3 al 54,42%. Esta disminución del número de embriones de buena calidad según avanza el desarrollo embrionario concuerda con los datos descritos por otros autores (Hardy *et al.*, 2001; Mantikou *et al.*, 2013).

Los resultados de esta tesis muestran diferencias entre el porcentaje de espermatozoides que presentan el AT2R en su superficie y las diferentes calidades embrionarias. En D+2 se observan diferencias entre los embriones de buena calidad (calidad B) y los de calidad subóptima (calidad C). Estas diferencias podrían ser debidas en parte a la fragmentación que presentan los embriones (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015) ya que el AT2R mantiene una correlación positiva con la fragmentación de la cohorte embrionaria. Por otra parte, al examinar la relación entre el AT2R y las calidades embrionarias en D+3, también se observan diferencias significativas entre los embriones de mayor calidad (calidades A y B) y los de calidad subóptima (calidad C). A pesar de ello, no se ve ninguna relación con los parámetros de número de células, fragmentación o simetría embrionaria. Lo que supondría que estas diferencias podrían deberse a otros parámetros embrionarios que se tienen en cuenta para la asignación de estas calidades como la multinucleación o la presencia de vacuolas (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015).

### **1.3.3. Desarrollo embrionario avanzado. Estadio de blastocisto**

Durante el desarrollo embrionario humano *in vitro*, se considera que un embrión alcanza el estadio de blastocisto en D+5 o D+6, aunque este rango de tiempo puede variar dependiendo del sistema de cultivo utilizado (ASEBIR, 2008). Conforme a los acuerdos alcanzados en el Consejo de Estambul sobre la evaluación de los embriones, el sistema de gradación de los blastocistos debe resultar de una combinación entre su evolución y la valoración de la masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo embrionario (TE) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Una de las clasificaciones propuestas sobre el estadio de evolución de los blastocistos, establece distintas categorías acordes a su evolución. Así, los blastocistos pueden ser clasificados como: blastocisto temprano (BT), blastocisto

cavitado o en expansión (BC), blastocisto expandido (BE), y blastocisto en eclosión o en fase de hatching (BHi) (Machtinger y Racowsky, 2013).

Debido a la complejidad del sistema de valoración de los blastocistos, en el que además de su estadio de evolución se realiza una valoración de la MCI y del TE, en este estudio únicamente se tuvo en cuenta el estadio de evolución en el que se encontraban los embriones tanto en D+5, como en D+6. Además, también se tuvieron en cuenta los embriones que se mantuvieron en cultivo y que tenían un desarrollo más lento, que se habían quedado en fase mórula compacta (MC) o cuyo desarrollo se habían bloqueado o habían degenerando (NV). De igual forma, se quiso evaluar la relación del AT2R con los embriones que habiendo llegado a estadio de blastocisto, en D+5 y D+6, habían sido considerados finalmente como viables o no viables.

Tras analizar la relación existente entre el porcentaje de espermatozoides que presentaban el AT2R en su superficie con la evolución embrionaria, no se observó ninguna diferencia entre los porcentajes de espermatozoides que presentan el AT2R en su membrana y los distintos estadios de evolución en D+5 y D+6. A pesar de que estudios previos muestran que el eje AngII/AT1R/AT2R/ACE está implicado en la evolución de los embriones en estadios avanzados del desarrollo. Ya que el bloqueo de los receptores de Ang II, favorece la eclosión de los embriones, es decir, que los embriones progresen en su desarrollo (Pijacka *et al.*, 2012). Sin embargo, sí se obtuvieron diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoide que presentan el AT2R y la viabilidad de los blastocistos en D+5, observándose una relación positiva entre el porcentaje de espermatozoides positivos para el AT2R y la viabilidad de los blastocistos generados. Estos datos concuerdan con el hecho de que el AT2R puede desempeñar un papel protector durante el desarrollo temprano, aumentando las posibilidades de supervivencia del embrión (Pijacka *et al.*, 2012), sugiriendo que el AT2R presente en espermatozoides podía también estar implicado en la viabilidad embrionaria. Teniendo en cuenta éstos resultados, se evaluó si el AT2R poseía valor predictivo para diferenciar de forma objetiva, los blastocistos viables de los no viables. Sin embargo, el análisis de la curva ROC mostró que este receptor no tiene valor predictivo en la determinación de la viabilidad de los blastocistos.

En último lugar, se quiso valorar si el porcentaje de espermatozoides que presentan el AT2R en su membrana tenía alguna relación con la generación de embriones que finalmente fueron transferidos, criopreservados o descartados. Una vez realizada la transferencia, cuando quedan embriones de buena calidad estos son criopreservados (Ley 14/2006, 2006), mientras que los embriones que no alcanzan una calidad óptima, han visto bloqueado su desarrollo o han degenerado son descartados. Este análisis mostró que el AT2R presente en los espermatozoides no tiene ninguna relación con el destino final de los embriones que generan.

En resumen, el AT2R podría ser usado como biomarcador de la fecundación mediante la técnica de FIV. Además, se han hallado diferencias entre el porcentaje de espermatozoides que presentan el AT2R en su superficie y las diferentes calidades de los embriones tempranos, encontrándose estas diferencias entre los embriones de buena calidad con los de calidad subóptima. Lo que deja ver que la presencia de un menor número de espermatozoides que expresan el AT2R en su membrana es beneficiosa para la calidad de los embriones. En este sentido, mientras que en D+2 estas diferencias pueden ser debidas en parte a la fragmentación que presentan los embriones, en D+3 podrían deberse a otros parámetros morfológicos embrionarios que no han sido analizados individualmente en este estudio. Sin embargo, el AT2R no tiene relación con la evolución de los embriones en fases más avanzadas del cultivo *in vitro*, pero podría estar contribuyendo de forma positiva en la viabilidad embrionaria. El hecho de que la proteína del AT2R se asocie con el desarrollo embrionario, demuestra que no solo fallos a nivel de la cromatina o del mRNA puedan afectar a la competencia y desarrollo embrionarios (Ostermeier *et al.*, 2005; Meseguer *et al.*, 2011; Piotrowska-Nitsche y Chan, 2013), sino que también las proteínas podrían estar participando en el desarrollo incluso en estadios previos a la activación genómica paterna (Barroso *et al.*, 2009).

### **1.4. Relación con los resultados de las TRA**

La principal finalidad de las TRA es la consecución de un recién nacido vivo sano (Van den Abbeel *et al.*, 2013). Sin embargo, una de las complicaciones más importantes de estas técnicas, es el embarazo múltiple. Lo que supone riesgos médicos (tanto perinatales como neonatales) e importantes consecuencias

socioeconómicas (Matorras y Hernández, 2007). La transferencia de un único embrión es una solución efectiva que minimiza la incidencia de embarazos múltiples (Matorras y Hernández, 2007; Ruvolo *et al.*, 2013). Considerando que hay que transferir un sólo embrión, la selección de este es crucial. Actualmente no hay ningún biomarcador que permita predecir este resultado, ya que la única herramienta disponible es la calidad del embrión a transferir (Machtinger y Racowsky, 2013). Debido a esto, se están llevando a cabo diversos estudios para encontrar marcadores oocitarios, embrionarios o seminales que ayuden a predecir el éxito de estos tratamientos (Alikani *et al.*, 2000; Balaban *et al.*, 2006; Garrido *et al.*, 2008; Meseguer *et al.*, 2011).

Con el objetivo de determinar si el AT2R podría ser usado como biomarcador de transferencia de un único embrión, se relacionó el porcentaje de espermatozoides que presentan este receptor con diferentes resultados de las TRA como las tasas de transferencia, embarazo bioquímico, implantación, y gestación clínica.

Los resultados de esta investigación no muestran que el AT2R esté relacionado con ninguna de estas variables analizadas. A pesar del hecho de que el AT2R está implicado en la invasión de las células del TE en el útero (Williams *et al.*, 2010), proceso esencial para la implantación embrionaria y el establecimiento de la placenta (Williams *et al.*, 2010; Pijacka *et al.*, 2012). Sin embargo, no se puede negar un posible efecto del AT2R con los parámetros analizados, debido a que en todos los casos los embriones transferidos fueron los que mejor calidad presentaban, y por tanto, esta selección positiva podría resultar un factor de sesgo en estos análisis. Al igual que se ha propuesto en otros trabajos (Meseguer *et al.*, 2006), serían necesaria la realización de futuros estudios en ausencia de esta selección embrionaria positiva para asociar estos parámetros con los niveles del AT2R.

A tenor de los resultados obtenidos en distintos estudios realizados con donantes de oocitos que demuestran cómo ni la edad de la receptora ni las posibles patologías afectan a los resultados de las TRA (Abdalla *et al.*, 1997; Bodri *et al.*, 2007; Matorras y Hernández, 2007). A la hora de analizar los resultados de este estudio, no se han tenido en cuenta estos factores.

## 2. PRR

Tradicionalmente se ha considerado a la Ang II como el principal péptido bioactivo del RAS. Sin embargo, con el descubrimiento de los RAS local e intracelular, cada vez se está teniendo más en consideración el papel efector de la renina. Tanto la renina, como la prorenina, pueden desencadenar distintos efectos intracelulares, a través de su unión al PRR (Re, 2003). De igual forma, se ha visto que el PRR se expresa en una gran variedad de células, entre las cuales destacan las células del músculo liso, las células cardíacas, las neuronas, las células endoteliales o los monocitos (Paul *et al.*, 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). En cuanto a su papel en la fertilidad masculina, el líquido seminal humano contiene prorenina y renina activas en cantidades mayores que el plasma sanguíneo (Craven *et al.*, 1981). Además, se ha observado una correlación directa entre el contenido de prorenina seminal y la densidad y movilidad de los espermatozoides (Mukhopadhyay *et al.*, 1995), lo que sugiere que el PRR podría estar presente en los espermatozoides humanos, pudiendo regular funciones esenciales en la fisiología espermática. Los resultados obtenidos en esta tesis, muestran la existencia del PRR en los espermatozoides humanos, lo que a su vez demuestra la presencia que el eje prorenina-renina/PRR, así como sus posibles implicaciones en la fisiología espermática.

### 2.1. Descripción del PRR en los espermatozoides humanos

Mediante el análisis de RT-PCR, se detectó la presencia del transcrito del PRR en los espermatozoides humanos. Como se ha comentado anteriormente, y debido a que los espermatozoides son células transcripcional y traduccionalmente inactivas (Miller y Ostermeier, 2006a), probablemente el PRR pudo haberse expresado y traducido durante la espermatogénesis. De igual manera, la retención selectiva del transcrito del PRR podría sugerir su participación en la compactación de la cromatina, la impronta génica, activar al cigoto, conferir el patrón espacial al embrión temprano o para ser traducido a proteína tras la fecundación, tal y como se ha descrito para otros transcritos (Miller y Ostermeier, 2006a; Miller y Ostermeier, 2006b; Lalancette *et al.*, 2008; Goto *et al.*, 2010).

Por otra parte, también se ha comprobado su presencia a nivel proteico en los espermatozoides humanos mediante inmunobloting, citometría de flujo e inmunocitoquímica. La técnica de western blot mostró que la proteína del PRR estaba presente en las células espermáticas. En estas células se detectó una banda de 56 KDa, mientras que en el tejido renal humano se detectaron dos bandas de diferentes pesos moleculares, 50 KDa y 70 KDa. A pesar de que el peso teórico para PRR es de 37 KDa, tras la clonación de ésta proteína transmembrana se determinó que su peso molecular real era de 45 KDa (Paul *et al.*, 2006). Sin embargo, distintos estudios muestran una disparidad en cuanto al tamaño de las bandas observadas en distintos tipos celulares que oscilan entre 28 KDa y 74 KDa (Yoshikawa *et al.*, 2011; Clavreul *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2013). Esto explicaría la diferencia en tamaño de las bandas obtenidas en los espermatozoides y el control positivo. Pero además, esto también puede ser debido, a las diferentes isoformas descritas para este receptor (Nguyen, 2011). Por otra parte, como se ha explicado con anterioridad, la detección de distintas bandas entre las muestras de espermatozoides y las de otros tipos celulares es un fenómeno bastante habitual (Naz y Sellamuthu, 2006).

Mediante citometría de flujo también se evidenció que este receptor está presente en los espermatozoides de origen humano, hallándose en aproximadamente un 70% de las células analizadas. Las imágenes de inmunocitoquímica confirmaron el porcentaje de espermatozoides positivos para el PRR determinado mediante citometría de flujo, ya que en ambas técnicas se observan valores similares. Por otra parte, se observó un intenso marcaje del PRR en la parte frontal de la cabeza espermática sobre la región acrosómica y en la parte posterior de la cabeza, y un marcaje más leve a lo largo de la cola. La principal localización del PRR coincide con la de otros componentes de distintos sistemas de señalización molecular como los receptores de quemoquinas 1, 3 y 5 (Isobe *et al.*, 2002; Muciaccia *et al.*, 2005), el receptor de progesterona (Jacob *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2005), el receptor de la GnRH (Lee *et al.*, 2000), o el receptor del factor decapacitante (Gibbons *et al.*, 2005), las cuales están implicadas en la regulación de funciones esenciales en los espermatozoides, como la movilidad, la quimiotaxis, la capacitación espermática, la reacción acrosómica y el proceso de fecundación (Naz y Sellamuthu, 2006). Teniendo en cuenta estos datos, el PRR podría estar relacionado con un amplio abanico de procesos fisiológicos que participan en la fertilidad masculina.

En resumen, este estudio describe por primera vez la presencia del PRR en los espermatozoides humanos tanto a nivel génico, como proteico. Además, se demuestra que este receptor se presenta en un elevado porcentaje de las células germinales masculinas, en las que se localiza principalmente en la región frontal de la cabeza espermática sobre la región acrosómica y en la parte posterior de la cabeza espermática, y en menor medida a lo largo de la cola. Además estos datos muestran por primera vez la presencia del eje prorrenina-renina/PRR en los espermatozoides humanos, de forma que en las células espermáticas se encuentran todos los ejes o vías en las que se divide el RAS, tanto la vía clásica como las alternativas, pudiendo ser todas ellas funcionalmente activas.

### **2.2. Relación con los parámetros seminales**

Con el propósito de evaluar su posible uso como biomarcador espermático de calidad seminal, se relacionaron los porcentajes de espermatozoides que presentaban el PRR en su superficie con los parámetros seminales básicos. Los resultados obtenidos muestran que la presencia de altos porcentajes de espermatozoides positivos para el PRR, se correlacionan de forma negativa con la concentración, y de forma positiva con la movilidad no progresiva de las muestras seminales tras ser procesadas. Estos datos sugieren que la presencia del PRR tiene un efecto negativo sobre la fisiología espermática, ya que las muestras que presentan un mayor porcentaje de espermatozoides positivos para el PRR se recuperan menos espermatozoides y con peor movilidad. Esta relación negativa con la movilidad, también ha sido observada en otras proteínas como el antígeno de membrana CD52 (Aboutorabi *et al.*, 2014), el receptor  $\mu$ -opioide (MOR) (Agirregoitia *et al.*, 2006), la neprilisina (NEP) (Subirán *et al.*, 2010) o el receptor canabinoide CB1 (Agirregoitia *et al.*, 2010). Estos datos, por tanto, sugieren que el PRR estaría afectando de forma negativa la capacidad fértil de los espermatozoides. Además, también se estudió la relación existente entre el porcentaje de espermatozoides que presentaban el PRR en su superficie con las distintas etiologías seminales descritas por la OMS (OMS, 2010), no observándose ninguna relación. Esto puede ser debido a que, como se ha indicado previamente, el número de casos de las distintas etiologías analizadas puede suponer un factor limitante a la hora del análisis, y por lo tanto de encontrar diferencias relevantes. Por ello, se consideran necesarios futuros

estudios que incluyan un mayor número de muestras de cada una de las diferentes patologías seminales.

En definitiva, se puede establecer que el PRR está relacionado negativamente con la concentración y movilidad de las muestras seminales. Sin embargo, no se ha podido determinar ninguna relación entre la expresión del PRR y las diferentes patologías seminales. Así, estos datos sugieren que el PRR podría estar implicado en la regulación negativa de la movilidad espermática, pero no podría ser considerado como un biomarcador de patología seminal

### **2.3. Relación con los parámetros embrionarios**

El siguiente objetivo fue investigar si el porcentaje de espermatozoides que presentaban el PRR en su superficie mantenían alguna relación con las tasas de fecundación oocitaria, con alguno de los parámetros de la calidad de los embriones tempranos o en fases avanzadas de su desarrollo *in vitro*, o con el destino final de los embriones.

#### **2.3.1. Fecundación del oocito**

A pesar de que el PRR se relaciona de forma negativa con la movilidad y teniendo en cuenta que una buena movilidad resulta indispensable para la fecundación del oocito (Bhilawadikar *et al.*, 2013), en el presente estudio no se observó ninguna correlación entre el porcentaje de espermatozoides positivos para el PRR y las tasas de fecundación de los distintos tratamientos de fecundación *in vitro*. En este sentido, el bajo número de ciclos en los que se llevado a cabo la técnica de FIV, como se ha mencionado anteriormente, puede resultar un factor limitante a la hora de encontrar alguna diferencia. Por lo que se cree necesario realizar futuros estudios que incluyan un mayor número de casos.

#### **2.3.2. Desarrollo embrionario temprano**

Recientemente se ha descubierto que el PRR junto con el Wnt y el receptor frizzled (complejo Wnt/FZ), son esenciales para la supervivencia celular y el desarrollo embrionario (Balakumar y Jagadeesh, 2011). En concreto, el PRR ha sido identificado como un adaptador entre la bomba  $H^+$ -ATPasa (V-ATPasa) y el complejo del receptor Wnt, participando en su vía de señalización (Nguyen,

2011; Binger y Muller, 2013). Teniendo en cuenta estos datos se quiso analizar si el porcentaje de espermatozoides que presentan el PRR en su superficie influyen en los parámetros embrionarios, con el objetivo de evaluar su posible uso como biomarcador espermático de calidad embrionaria.

En D+2 de desarrollo el porcentaje de embriones de buena calidad corresponde al 70,99%, y posteriormente en D+3 al 49,27%. Esta reducción del número de embriones de buena calidad según va progresando el desarrollo embrionario coincide con los datos obtenidos en otros estudios (Hardy *et al.*, 2001; Mantikou *et al.*, 2013).

Los resultados de este estudio no muestran diferencias entre el porcentaje de espermatozoides que presentan PRR en su superficie y las diferentes calidades embrionarias en D+2 y D+3 de desarrollo. Esto coincide con los datos obtenidos al analizar por separado el número de células, la fragmentación y la simetría, donde tampoco se pudo observar que el PRR mantuviese ninguna correlación con estos parámetros. Estos resultados sugieren que PRR espermático no tiene efecto sobre el desarrollo embrionario temprano.

### **2.3.3. Desarrollo embrionario avanzado. Estadio de blastocisto**

Asimismo, se quiso evaluar si el PRR tenía alguna implicación en las fases más avanzadas del desarrollo embrionario *in vitro*. Para ello, se relacionó con los distintos estadios de evolución embrionaria, con los embriones que habiendo llegado a estadio de blastocisto habían sido considerados como viables o no viables, y con el destino final de los embriones.

Tras analizar la relación existente entre el porcentaje de espermatozoides que presentaban el PRR en su superficie y la evolución embrionaria, no se observó ninguna diferencia entre los distintos estadios de evolución en D+5. Sin embargo, sí se obtuvieron diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides que presentan el PRR y la viabilidad de los blastocistos. Concretamente, se vio que un menor porcentaje de espermatozoides positivos para el PRR se asocia con una mayor viabilidad de los blastocistos en D+5. Mientras que en D+6, se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de espermatozoides que presentan el PRR en su membrana y los embriones en distintos estadios de evolución, pero no en la viabilidad embrionaria. Concretamente, las diferencias entre los distintos estadios de evolución, se daban entre los embriones

degenerados o bloqueados y los blastocistos más evolucionados. En general, las muestras seminales con un menor porcentaje de espermatozoides positivos para el PRR tienden a generar blastocistos con mayor viabilidad y embriones en estadios del desarrollo más evolucionados. Estos datos concuerdan con estudios previos que indican que el PRR, mediante la formación del complejo receptor Wnt, está implicado en el desarrollo embrionario y viabilidad celular (Nguyen, 2011; Balakumar y Jagadeesh, 2011; Binger y Muller, 2013).

Tras observar la existencia de diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides que presentan el PRR y la viabilidad de los blastocistos en D+5, se decidió a evaluar si este receptor poseía valor predictivo para diferenciar de forma objetiva, los blastocistos viables de los no viables. El análisis de la curva ROC, mostró que el PRR no tiene valor predictivo para diferenciar la viabilidad de los blastocistos.

Finalmente, se evaluó si el porcentaje de espermatozoides que presentan el PRR en su membrana tenía alguna relación con la generación de embriones que finalmente fueron transferidos, criopreservados o descartados. Este análisis mostró que la presencia del PRR en los espermatozoides no se relaciona con el destino final de los embriones.

En conclusión, el PRR no tendría aplicación como marcador pronóstico del potencial fecundante, del desarrollo embrionario temprano o del destino final de los embriones. Sin embargo, altos niveles del PRR podrían influir de forma negativa en la evolución de los embriones en fases avanzadas del cultivo embrionario *in vitro* y en la viabilidad de los blastocistos.

## **2.4. Relación con los resultados de las TRA**

Con el objetivo de determinar si el PRR podría ser usado como biomarcador de transferencia de un único embrión o si influye en los resultados de las TRA, se relacionó el porcentaje de espermatozoides que presentan PRR con las variables de transferencia embrionaria, embarazo bioquímico, implantación o gestación clínica.

Así, los resultados de este estudio muestran como el PRR presente en espermatozoides no se asocia con ninguna de estas variables. A pesar de ello, se

ha sugerido que el PRR podría tener un papel clave en la invasión de la células del TE en el útero materno, proceso esencial para la implantación embrionaria (Pringle *et al.*, 2011). No obstante, no se puede negar un posible efecto del PRR con los parámetros analizados, ya que en todos los casos los embriones transferidos fueron los de mejor calidad, pudiendo constituir un factor de sesgo en estos análisis. Y al igual que se ha propuesto en otro estudio (Meseguer *et al.*, 2006), en ausencia de esta selección embrionaria, estos parámetros podrían asociarse con los niveles espermáticos del PRR.

### 3. tACE

La tACE, ha sido detectada en los espermatozoides postmeióticos de distintas especies, incluido el hombre (Vanha-Pertulla *et al.*, 1985; Brentjens *et al.*, 1986; Dobrinski *et al.*, 1997), en los que está presente tanto a nivel génico como proteico. En los espermatoцитos y espermatozoides maduros humanos (Pauls *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2014) la tACE se localiza principalmente en la membrana plasmática de la región acrosomal, en el segmento ecuatorial, en la región postacrosomal y en la pieza intermedia (Ganong, 1995; Kohn *et al.*, 1998b). Además, se ha visto que sus niveles varían durante las diferentes fases del proceso de fecundación, observándose que parte de la tACE es eliminada de la superficie de los espermatozoides durante el proceso de capacitación, aumentando así su capacidad de unión a la ZP del oocito (Kohn *et al.*, 1995; Kamata *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2013). Este hecho podría explicar que el porcentaje de espermatozoides en los que se ha detectado la tACE en este estudio sea aproximadamente un 25%, ya que éstos provenían de muestras procesadas.

El mecanismo a través del cual la tACE participa en la función espermática todavía no se conoce en detalle, aunque, distintos estudios han mostrado su implicación en la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica, y en la capacidad fecundante *in vitro* (Singh *et al.*, 1985; Foresta *et al.*, 1987; Foresta *et al.*, 1991; Kohn *et al.*, 1995). Estudios realizados en animales, demostraron que la eliminación del gen de la tACE no influye en el número de espermatozoides, en su morfología o en su movilidad, pero sí que causa anomalías en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del oocito (Hagaman *et al.*, 1998). En la presente tesis se describe la relación que la tACE mantiene con los parámetros y etiologías seminales, con la fecundación, así como su implicación en el desarrollo y viabilidad embrionarias.

#### 3.1. Relación con los parámetros seminales

El primer objetivo propuesto fue evaluar el posible papel de la tACE como biomarcador espermático de calidad seminal. Para ello, se tuvieron en cuenta los porcentajes de espermatozoides que presentaban la tACE en su superficie, al

igual que el número medio de moléculas de tACE por espermatozoide, ambos medidos mediante citometría de flujo. Estos datos se relacionaron con los parámetros seminales básicos de volumen, concentración y movilidad. En cuanto al porcentaje de espermatozoides positivos para la tACE, éste únicamente se correlaciona de forma positiva con la movilidad no progresiva de las muestras seminales en fresco. Sin embargo, al analizar el número medio de moléculas de tACE por espermatozoide se observaron correlaciones con los tres parámetros seminales. Por un lado, la media de esta enzima por espermatozoide correlaciona de forma positiva con la movilidad no progresiva de las muestras tras ser procesadas. Mientras que por otro lado, se correlaciona de forma positiva con el volumen de las muestras en fresco, y de forma negativa con la concentración de las muestras procesadas. Esto puede ser debido a que cuanto mejores son las muestras en fresco, tras su recuperación estas van a tener un mayor volumen y/o concentración espermática (Balaban *et al.*, 2014; Malvezzi *et al.*, 2014). El hecho de que la tACE se asocie a muestras seminales de baja calidad, ya que se correlaciona de forma negativa con el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos de las muestras seminales, concuerda con la obtención de una menor concentración espermática, independientemente del volumen inicial de la muestra en fresco. Así, los espermatozoides que presentan un mayor número de moléculas de esta enzima en su superficie se relacionan con una menor concentración espermática y una mayor movilidad no progresiva, indicando que la tACE estaría afectando de forma negativa a estos parámetros seminales. Esta relación negativa de tACE con la movilidad y la concentración concuerda con lo observado por otros autores (Siems *et al.*, 1991; Kohn *et al.*, 1998a; Shibahara *et al.*, 2001) y es consistente con el hecho que la tACE sea eliminada durante el proceso de capacitación (Kohn *et al.*, 1995; Kamata *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2013) para aumentar su capacidad de unión a la ZP (Kamata *et al.*, 2001).

Además de los parámetros seminales básicos, también se estudió si la tACE mantenía algún tipo de relación con las distintas etiologías seminales analizadas. Para así, poder determinar su posible valor como marcador diagnóstico de dichas patologías. Aunque no se observó ninguna relación entre las etiologías seminales y los porcentajes de espermatozoides que presentaban la tACE en su superficie o el número medio de moléculas de tACE por espermatozoide, sí que se vio que los pacientes oligozoospermicos tendían a presentar mayores porcentajes de espermatozoides positivos para esta enzima que el resto de pacientes con otras

etiologías. Lo que concuerda con lo observado previamente en otro estudio, donde varones normozoospermicos en comparación con oligoastenozoospermicos, presentaban menores cantidades de tACE en su membrana, sugiriendo que la eliminación de la tACE de la membrana espermática es un proceso que sucede de forma fisiológica en estas células para adquirir la capacidad fecundante (Shibahara *et al.*, 2001). Sin embargo, el bajo número de casos de cada una de las etiologías en este estudio podría suponer un factor limitante a la hora del análisis, por lo que futuros estudios serán necesarios para demostrar de forma más contundente esta tendencia.

En conclusión, estos datos confirman que la tACE está relacionada con los parámetros seminales de concentración, volumen y movilidad espermática. Curiosamente, los resultados obtenidos muestran que mientras la presencia o ausencia de la tACE no mantiene ninguna relación con estos parámetros seminales, los niveles de la tACE por espermatozoide sí que están asociados con dichos parámetros. De forma que, para que haya una buena calidad seminal resulta más importante el número de moléculas de tACE que su presencia o ausencia. Por otra parte, no se ha podido determinar ninguna relación entre la tACE y las diferentes patologías seminales, ni al considerar el número de moléculas por espermatozoide, ni al considerar el porcentaje de espermatozoides positivos para dicha enzima. No obstante, en relación a dichas patologías se necesitarían posteriores estudios más detallados que aporten unos resultados más consistentes.

### **3.2. Relación con los parámetros embrionarios**

Al igual que con los receptores del RAS estudiados, se quiso estudiar si la tACE mantenía alguna relación con las tasas de fecundación, con la calidad de los embriones tempranos, con la viabilidad de los blastocistos o con el destino final de los embriones. En este caso, no sólo se tuvieron en cuenta los porcentajes de espermatozoides que presentaban la tACE en su superficie, sino también el número medio de moléculas de tACE por espermatozoide.

### 3.2.1. Fecundación del oocito

La tACE ha sido descrita como una molécula esencial para la fecundación, y como ya se ha comentado, fallos en la fecundación pueden ser debidos al uso de espermatozoides con defectos moleculares (Li *et al.*, 2014). Uno de estos defectos moleculares podría ser la ausencia de esta proteína, como quedó demostrado en experimentos con animales knock-outs para la tACE donde se vio que estos animales eran infértiles (Hagaman *et al.*, 1998; Fuchs *et al.*, 2005). Por otra parte también se ha observado que los varones que presentan mutaciones en el gen que codifica para la tACE y que resultan en proteínas no funcionales, son infértiles (Li *et al.*, 2014). Todos estos datos demuestran que la tACE está directamente asociada con la fertilidad del varón (Foresta *et al.*, 1991; Shibahara *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio, no muestran ninguna correlación entre la tACE y las tasas de fecundación, ni al analizar la presencia/ausencia de la enzima, ni al analizar la media de moléculas de enzima por espermatozoide. Se ha descrito que los espermatozoides necesitan poseer diferentes características moleculares dependiendo de si se trata de concepción natural o asistida, e incluso si es mediante TRA, dichas características moleculares también difieren dependiendo de si la técnica usada es IA, FIV o ICSI. Así, estos requerimientos moleculares espermáticos van variando, siendo mayores cuanto más se asemeje a la fecundación natural (Garrido *et al.*, 2008; Garrido *et al.*, 2013). En este sentido, el hecho de que la tACE sea una molécula esencial tanto para la reacción acrosómica (Foresta *et al.*, 1991), como para la unión del espermatozoide a la ZP (Hagaman *et al.*, 1998) podría explicar la ausencia de relación con las tasas de fecundación mediante la técnica de la ICSI. Ya que durante la realización de esta técnica se obvian estos pasos al inyectar directamente el espermatozoide en el oocito. Por otra parte, el hecho de no encontrar ninguna relación entre las tasas de fecundación mediante la técnica de FIV y la tACE, podría ser debido al bajo número de ciclos en los que se ha realizado esta técnica, lo que podría constituir un factor limitante. Debido a ello, serían necesarios posteriores estudios para demostrar de forma más consistente esta relación.

### 3.2.2. Desarrollo embrionario temprano

La tACE aparece en las células espermáticas postmeióticas y su expresión aumenta rápidamente en las subsiguientes etapas del desarrollo espermático

(Pauls *et al.*, 2003). Por otra parte, su enzima homóloga en el resto de tejidos, la sACE, se expresa en las células germinales durante el desarrollo fetal, sugiriendo que podría desempeñar algún papel en el desarrollo de las células germinales humanas y/o en la ontogenia (Pauls *et al.*, 2003; Franke *et al.*, 2003). Además, estudios sobre el desarrollo embrionario han demostrado que la Ang II actúa como un factor de crecimiento, siendo además producida por el propio embrión al principio de la gestación. Lo que coincide con el aumento la actividad de la sACE de los tejidos embrionarios conforme progresa el embarazo (Pijacka *et al.*, 2012). Todos esos datos sugieren que la sACE podría estar implicada en el desarrollo y evolución celular y/o embrionaria. Debido a que los espermatozoides presentan exclusivamente la isoforma testicular, se quiso analizar si la tACE también podría ejercer alguna función en el desarrollo del futuro embrión. Especialmente, se ha querido estudiar si la tACE influye en los parámetros embrionarios, con el objetivo de evaluar su posible uso como biomarcador espermático de la calidad embrionaria.

El porcentaje de embriones de buena calidad en D+2 es del 71,97%, mientras que en D+3 este porcentaje se reduce hasta el 48,50%. Esta disminución del número de embriones de buena calidad conforme avanza el desarrollo embrionario concuerda con los datos descritos por otros autores (Hardy *et al.*, 2001; Mantikou *et al.*, 2013).

Los resultados de esta tesis muestran que los grupos de embriones de distinta calidad provienen de muestras seminales con diferentes porcentajes de espermatozoides positivos para la tACE. Concretamente, en D+2 se observaron diferencias entre los embriones de buena calidad (calidades A y B) y los de mala calidad (calidad D), siendo menor el porcentaje de espermatozoides que presentan la tACE en los embriones de peor calidad. Por otra parte, al analizar por separado el número de células, la fragmentación y la simetría, se pudo ver como la tACE no mantiene ninguna relación con estos parámetros. Lo que sugiere que las diferencias en la calidad embrionaria podrían ser debidas a otros parámetros no tenidos en cuenta en este estudio, como la multinucleación o la presencia de vacuolas (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015). De igual manera en D+3, al analizar el porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima con los grupos de embriones correspondientes a las distintas calidades, se observaron diferencias entre los embriones de buena calidad (calidad A) y los de calidad subóptima (calidad C) con el grupo de embriones de mala calidad. Tras estudiar

los parámetros de número de células, fragmentación y simetría, se vio que estas diferencias podrían ser debidas en parte a la fragmentación que presentan los embriones (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015) ya que el porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima mantiene una correlación negativa con la fragmentación de la cohorte embrionaria en D+3.

Por otra parte, al analizar la relación entre la media de enzimas por espermatozoide tanto con las distintas calidades embrionarias, como con los parámetros individuales de número de células fragmentación o simetría en D+2 y en D+3, no se observó ninguna diferencia o correlación significativa.

En resumen, la presencia de tACE en los espermatozoides estaría influyendo en la calidad de los embriones tempranos, independientemente de los niveles de dicha enzima en los espermatozoides. Estos resultados, además, refuerzan el papel del espermatozoide en el desarrollo embrionario incluso antes de que la maquinaria traduccional del embrión sea activada, cambiando la concepción de que el espermatozoide es un mero vehículo para transportar el DNA paterno (Meseguer *et al.*, 2006).

### **3.2.3. Desarrollo embrionario avanzado. Estadio de blastocisto**

En segundo lugar, se quiso evaluar la relación de la tACE con la evolución de los embriones, la viabilidad de los blastocistos en etapas más avanzadas del desarrollo embrionario *in vitro*, y con el destino final de los embriones.

No se observó ninguna diferencia en los porcentajes de espermatozoides que presentan la tACE en su membrana entre los embriones en distintos estadios de evolución en D+5 y en D+6. Sin embargo, al analizar el valor medio de moléculas de tACE por espermatozoide en los embriones en distintos estadios de evolución en D+5, si se observaron diferencias significativas entre los grupos de embriones que se habían degenerando o bloqueado y los menos desarrollados con los grupos de blastocistos que habían progresado más en su desarrollo. Sugiriendo que la presencia de un menor número de moléculas de tACE podría ser beneficioso en el desarrollo embrionario avanzado, tal y como se ha descrito para otras proteínas (Meseguer *et al.*, 2006). Estos resultados podría coincidir con la función de su homóloga en otros tejidos, la sACE, cuya expresión decrece según aumenta el desarrollo (Yoshimura, 1997). Además, estudios previos indican que el eje AngII/AT1R/AT2R/ACE parece estar implicado en la evolución

de los embriones en estadios avanzados del desarrollo, ya que el uso de bloqueadores de los receptores de Ang II, péptido formado por la acción de la ACE sobre el AGT, producen un aumento del número de embriones eclosionados, es decir, promueven el desarrollo embrionario al favorecer su evolución hasta estadios más avanzados (Pijacka *et al.*, 2012).

Igualmente, se analizó la viabilidad de los blastocistos en relación al porcentaje de espermatozoides positivos para la tACE, y al número de moléculas de esta enzima por espermatozoide, no observándose ninguna diferencia significativa en ninguno de los dos casos. Sin embargo, los embriones considerados como viables tendían a ser generados por muestras seminales con un menor número de moléculas de tACE por espermatozoide, siendo más evidentes estas tendencias en D+5 que en D+6. Estos datos, son consistentes con el hecho de que los embriones más desarrollados provenían de muestras seminales con menores niveles de tACE en D+5 de evolución embrionaria.

Finalmente, se evaluó si el porcentaje de espermatozoides que presentan la tACE en su membrana tenía alguna relación con la generación de embriones que finalmente fueron transferidos, criopreservados o descartados. Este análisis mostró que la presencia de la tACE en los espermatozoides no tiene ninguna relación con el destino final de los embriones que generan, ni al analizar los porcentajes de espermatozoides que presentaban la tACE en su superficie, ni con el número medio de moléculas de tACE por espermatozoide.

En definitiva, la tACE no tendría ninguna aplicación como marcador pronóstico del potencial fecundante, la viabilidad de los blastocistos o del destino final de los embriones. Sin embargo, se puede intuir que esta enzima podría participar de forma negativa en el desarrollo embrionario. No obstante, para poder afirmar esta observación serían necesarios futuros estudios.

### **3.3. Relación con los resultados de las TRA**

Con el objetivo de determinar si la tACE podría ser usada como biomarcador de transferencia de un único embrión o si influía de alguna manera en los resultados de las TRA, se relacionaron los porcentajes de espermatozoides que presentaban la tACE en su superficie, y el número medio de moléculas de tACE por espermatozoide con las variables de transferencia embrionaria, embarazo bioquímico, implantación o gestación clínica.

Como en los anteriores componentes del RAS, los resultados de este estudio muestran como la tACE no está relacionada con los resultados de transferencia embrionaria, embarazo bioquímico, implantación o gestación clínica. Pero al igual que en los casos anteriores, no se puede negar un posible efecto de esta enzima con los parámetros analizados, ya que en todos los casos los embriones transferidos fueron los que mayor calidad presentaban, pudiendo constituir un factor de sesgo en estos análisis, como ya se ha sido observado en estudios previos (Meseguer *et al.*, 2006). Por lo que para ver estos efectos serian necesarios futuros estudios en los que no se produzca esa selección positiva.

## 4. APN

La APN es una enzima que se puede encontrar tanto en el líquido seminal, como en los espermatozoides humanos (Fernández *et al.*, 2002; Irazusta *et al.*, 2004; Subirán *et al.*, 2008). En estos últimos, esta enzima ha sido detectada tanto a nivel génico como proteico. En los gametos masculinos humanos la APN se localiza en la membrana plasmática del segmento ecuatorial de la región postacrosomal de la cabeza espermática, en el cuello y uniformemente distribuida a lo largo de la cola (Subirán *et al.*, 2008). Se encuentra ampliamente distribuida en los espermatozoides humanos (Subirán *et al.*, 2008), lo que concuerda con los resultados obtenidos mediante la técnica de citometría de flujo donde se detectó su presencia en aproximadamente un 88% de los espermatozoides analizados.

Los primeros estudios funcionales realizados con esta enzima se llevaron a cabo en espermatozoides de mejillón, en los que se observó que la APN podría estar implicada en la reacción acrosómica, ya que interacciona con moléculas presentes en la membrana del oocito, induciendo así, la liberación del contenido acrosomal (Togo y Morisawa, 1997; Togo y Morisawa, 2004). Posteriormente, estudios realizados con espermatozoides humanos, mostraron que esta enzima regula la movilidad espermática, ya que su inhibición mejora la movilidad de los espermatozoides en fresco y capacitados, aumentando la movilidad progresiva lineal (Subirán *et al.*, 2008; Subirán *et al.*, 2010). En este trabajo se ha ampliado el conocimiento sobre el papel de la APN en la fertilidad humana. Concretamente, la APN se relaciona con los distintos parámetros y etiologías seminales, así como con desarrollo embrionario en fases avanzadas del cultivo *in vitro* y la viabilidad de los blastocistos.

### 4.1. Relación con los parámetros seminales

Al igual que en los casos anteriores, uno de los primeros objetivos planteados fue examinar la relación de la APN con los parámetros seminales básicos de volumen, concentración y movilidad, así como con las diferentes etiologías seminales. Este objetivo se llevó a cabo con la intención de evaluar su posible uso como biomarcador espermático de calidad seminal. Al igual que con la tACE, se

analizó el porcentaje de espermatozoides que presentaban la APN en su superficie y el número medio de moléculas de APN por espermatozoide. De esta forma se determinó que la APN está relacionada con todos los parámetros seminales básicos estudiados. Aunque estas relaciones difieren según si se refieren al porcentaje de espermatozoides positivos o al valor medio de enzima por espermatozoide.

En cuanto a la relación con el porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima, se observó que se encuentra negativamente correlacionada con el volumen de las muestras en fresco, mientras que con las muestras procesadas mantiene una correlación positiva. Además, en relación a la concentración, exhibía una correlación positiva con la concentración de las muestras procesadas. Como se ha relatado anteriormente, estas correlaciones podrían deberse a la forma de procesar las muestras seminales para usar en la técnica de la ICSI. Ya que resulta preferible trabajar con concentraciones seminales diluidas para facilitar el proceso de selección y captura de un único espermatozoide para microinyectar (Matorras y Hernandez, 2007). Debido a ello, cuanto mejores son las muestras en fresco, éstas presentan un mayor volumen y/o concentración de espermatozoides recuperados tras el procesamiento seminal, lo que es consistente con las correlaciones obtenidas en este estudio. Sin embargo, al analizar la relación del valor medio de moléculas de APN por espermatozoide, se observó una correlación negativa con la concentración de las muestras procesadas. Estos datos son consistentes con resultados previos de nuestro grupo de investigación, en los que se vio que la actividad enzimática de la APN se correlaciona de forma negativa con la concentración de las muestras seminales (Irazusta *et al.*, 2004).

Finalmente, en cuanto a la relación de la APN con el parámetro de movilidad de las muestras en fresco, el porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima mantiene una correlación positiva con el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y una correlación negativa con el porcentaje de espermatozoides inmóviles. En cuanto al número medio de moléculas de APN por espermatozoide, también se observó que mantiene una correlación positiva con el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, y negativa con el porcentaje de los espermatozoides móviles no progresivos de las muestras en fresco. Estos resultados confirman resultados previos de nuestro grupo de investigación, en los que la actividad de esta enzima se correlaciona

positivamente con la movilidad de las muestras en fresco (Irazusta *et al.*, 2004). Por otra parte, al analizar las muestras procesadas, mientras que no se observó ninguna relación entre el porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima y el parámetro de movilidad, el número medio de moléculas por espermatozoide presentaba una correlación positiva con el porcentaje espermatozoides móviles no progresivos. Esta relación negativa con la movilidad de las muestras procesadas, confirma los resultados previos de nuestro grupo de investigación en los que la inhibición de la APN mejora la movilidad de los espermatozoides capacitados, aumentando su movilidad progresiva lineal (Subirán *et al.*, 2010; Subirán *et al.*, 2012).

Además de los parámetros seminales básicos, también se analizó su relación con las distintas etiologías seminales descritas por la OMS (OMS, 2010), para determinar si la APN podría servir como biomarcador de estas patologías seminales. Al analizar el porcentaje de espermatozoides positivos para la APN y las diferentes etiologías seminales se evidenció que los varones astenozoospermicos presentaban un menor porcentaje de espermatozoides positivos para la APN que los varones normozoospermicos y los teratozoospermicos, hallándose únicamente diferencias significativas entre los astenozoospermicos y los teratozoospermicos. Estos datos podrían explicar resultados previos en los que se vio que la actividad enzimática de la APN era menor en pacientes astenozoospermicos en comparación con los normozoospermicos (Irazusta *et al.*, 2004). No obstante, el bajo número de casos incluidos en los grupos de pacientes astenozoospermicos y oligozoospermicos debido a los criterios de inclusión de las muestras, puede ser un factor limitante en la observación de mayores diferencias. Teniendo esto en cuenta, sería necesario realizar futuros estudios en los que se incluyan un mayor número de casos.

Tras observar que los porcentajes de espermatozoides que presentan la APN en su membrana son inferiores en los pacientes astenozoospermicos en comparación con los teratozoospermicos, se evaluó si la APN poseía valor predictivo para diferenciar de forma objetiva, muestras de pacientes con estas dos patologías, a pesar de conocer el escaso valor clínico de esta relación. El análisis de la curva ROC mostró que aunque este receptor no tiene valor predictivo para diferenciar las muestras seminales con estas etiologías ( $AUC^{ROC}$  de 0,79), estaba muy cerca de tenerlo, ya que se considera que tendría valor

predictivo cuando del área bajo la curva sea de 0,8. Por lo que, a continuación se estableció un punto de corte de superior de 1931 moléculas de APN por espermatozoide, que dieron lugar valores de sensibilidad y especificidad poco útiles para poder establecer un posible valor predictivo. En concreto se obtuvieron unos valores de sensibilidad del 80,6%, es decir, de diferenciar muestras seminales de pacientes astenozoospermicos, y una especificidad de diferenciar muestras de pacientes teratozoospermicos del 50%, lo que confirmaba su nula aplicación clínica como test predictivo.

En resumen, la APN está relacionada con el volumen, la concentración y movilidad de las muestras seminales, tanto si nos referimos en porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima, como al número de moléculas de APN por espermatozoide. Además, los niveles de esta enzima en pacientes astenozoospermicos son menores que los observados en el resto de las patologías. Sin embargo, no hay ninguna relación entre el porcentaje de espermatozoides que presentan esta enzima y las distintas etiologías seminales. Por lo que estos resultados corroboran que la APN está implicada en la regulación de la movilidad espermática, aunque no puede ser considerada como un valor predictivo de astenozoospermia.

## **4.2. Relación con los parámetros embrionarios**

De manera similar a todos los demás elementos del RAS estudiados, se quiso analizar si la APN mantenía alguna relación con las tasas de fecundación, la calidad y evolución de los embriones, la viabilidad de los blastocistos y el destino final de los embriones. Para lo cual, se tuvieron en cuenta los porcentajes de espermatozoides que presentaban la APN en su membrana, y el número medio de moléculas de APN por espermatozoide.

### **4.2.1. Fecundación del oocito**

Estudios funcionales realizados en espermatozoides de mejillón mostraron como la APN podría estar implicada en los procesos de fecundación al participar en la liberación del contenido acrosomal (Togo y Morisawa, 1997; Togo y Morisawa, 2004). Además, debido a su localización en el segmento ecuatorial y en la región postacrosomal, la APN podría desempeñar algún papel en dicho proceso, como

se ha sugerido para potras proteínas presentes en dicha localización (Calamita *et al.*, 2001; Subirán *et al.*, 2008). Sin embargo, tras analizar los resultados extraídos de este estudio, no se observó ninguna relación entre el porcentaje de espermatozoides positivos para la APN, o las moléculas de APN por espermatozoide y las tasas de fecundación. En el caso de las tasas de fecundación obtenidas mediante la técnica de la ICSI, estos resultados podrían ser debidos a que no es necesario que se produzca la reacción acrosómica, ya que el espermatozoide es directamente inyectado en el oocito; y como ya se expuesto anteriormente, cuanto más invasivas son las TRA los requerimientos moleculares espermáticos son menores (Garrido *et al.*, 2008; Garrido *et al.*, 2013; Sakkas *et al.*, 2015). Por otra parte, el no haber observado ninguna relación con la tasas de fecundación mediante la técnica de FIV, a pesar de la localización de la APN en el espermatozoide, podría ser debido al bajo número de casos en los que se ha llevado a cabo esta técnica, lo que puede resultar un factor limitante a la hora de encontrar alguna diferencia. Razón por la cual se considera necesaria la realización de posteriores estudios que permitan comprobar esta relación.

#### **4.2.2. Desarrollo embrionario temprano**

Considerando que la APN juega un papel importante en procesos de desarrollo, concretamente en el desarrollo de las células madre embrionarias humanas (Inonue *et al.*, 1994), se quiso comprobar si la APN espermática podría estar influyendo en los parámetros morfológicos y morfocinéticos embrionarios para evaluar su posible uso como biomarcador espermático de la calidad embrionaria.

Al igual que los anteriores casos, el porcentaje de embriones de buena calidad en D+2 es del 72,34%, mientras que en D+3 disminuye hasta el 49,59%. Esta reducción del número de embriones de buena calidad según avanza el desarrollo embrionario es coherente con lo observado por otros autores (Hardy *et al.*, 2001; Mantikou *et al.*, 2013).

Al examinar el porcentaje de espermatozoides positivos para esta enzima en relación a la calidad embrionaria, no se evidenció ninguna diferencia entre las distintas calidades de los embriones tempranos (D+2 y D+3). Sin embargo, mantiene una correlación positiva con la simetría en D+3 (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015). Estos datos concuerdan con los resultados previos en los que otras enzimas espermáticas están relacionadas con la simetría y el desarrollo embrionario temprano (Meseguer *et al.*, 2006). A pesar de esta asociación, la

asimetría que puede generar la APN en los embriones, no sería suficiente como para modificar su calidad.

Por otra parte, al estudiar el número medio de moléculas de APN por espermatozoide y la calidad embrionaria se observaron diferencias entre los embriones de distintas calidades tanto en D+2, como en D+3. Concretamente, en D+2 entre los embriones mala calidad (calidad D) y el resto de los embriones (calidades A, B y C), y entre los embriones de buena calidad (entre los de calidades A y B), y en D+3 entre los embriones de buena calidad (calidad B) y los de mala calidad. Siendo beneficiosa para la calidad de los embriones, la presencia de un menor número de moléculas de APN en los espermatozoides. Sin embargo, al analizar de forma individual los parámetros de número de células, fragmentación o simetría, se determinó que dichos parámetros no presentan ninguna correlación con el número de moléculas de APN por espermatozoide. Por lo tanto, estas diferencias en la calidad embrionaria podrían ser debidas a otros parámetros no tenidos en cuenta en este estudio, como la multinucleación, la presencia de vacuolas, el contorno citoplasmático o la zona pelúcida (ASEBIR, 2008; ASEBIR, 2015). En ambos casos, la presencia de un menor número de moléculas de APN en los espermatozoides que generan estos embriones, parece resultar favorable para el desarrollo embrionario. Estos datos refuerzan los resultados de estudios previos en los que se advirtió que las proteínas presentes en los espermatozoides eran capaces de influir en el desarrollo embrionario (Bhilawadikar *et al.*, 2013) incluso antes de la activación genética paterna en D+3 (Barroso *et al.*, 2009).

En resumen, estos resultados podrían estar revelando que mientras el número medio de enzimas de APN que presentan los espermatozoides sería relevante en la calidad embrionaria, su presencia no lo sería tanto. Siendo beneficiosa para la formación de embriones de mejor calidad en estadios tempranos, la presencia de un menor número de moléculas de APN en los espermatozoides.

### **4.2.3. Desarrollo embrionario avanzado. Estadio de blastocisto**

Igualmente, se quiso evaluar la relación de la APN con la evolución embrionaria, la viabilidad de los blastocistos en D+5 y D+6 y el destino final de los embriones. De forma que se evaluase su posible valor como biomarcador predictivo del desarrollo y viabilidad embrionaria.

En primer lugar se estudió la relación entre el porcentaje de espermatozoides que presentaban la APN en su membrana y la evolución embrionaria, no evidenciándose ninguna diferencia entre los porcentajes de espermatozoides que presentan la APN y los embriones en distintos estadios de evolución ni en D+5, ni en D+6. Sin embargo, mientras que en D+5 no había ninguna diferencia, en D+6 sí se observaron diferencias significativas entre el valor medio de moléculas de APN por espermatozoides y los embriones en distintos estadios de evolución. Concretamente entre los blastocistos que habían progresado más en su desarrollo y los blastocistos tempranos, los bloqueados y los degenerados. Debido a que los blastocistos con mayor grado de desarrollo presentan menores valores medios de APN, un menor número de moléculas de APN podría ser beneficioso en el desarrollo embrionario en fases avanzadas del cultivo *in vitro*, al igual que sucede en la formación de embriones de mejor calidad en estadios tempranos. Estos resultados podrían suponer que la APN estaría implicada, de alguna manera, en el desarrollo de los blastocistos, lo que concuerda con un estudio previo en el que se determinó que la APN estaría interviniendo en diferentes procesos de desarrollo (Moeller *et al.*, 1996). Asimismo, otros estudios han observado cómo la actividad de determinadas enzimas presentes en los espermatozoides también están asociadas con la obtención de mejores blastocistos (Meseguer *et al.*, 2006).

De igual forma, al analizar la viabilidad de los blastocistos se vio que aquellos que habían sido considerados viables procedían de espermatozoides con un menor valor medio de moléculas de APN en su membrana. Estos datos sugieren que la APN espermática estaría relacionada con la viabilidad de los embriones, lo que coincide con resultados previos en los que se relaciona la APN con los procesos de apoptosis y muerte celular (Shishido *et al.*, 1999; Odaka *et al.*, 2002; Piva *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta estos resultados, se quiso determinar si el número de moléculas de APN podría tener valor predictivo para diferenciar de forma objetiva, blastocistos viables de blastocistos no viables. Tras el análisis de la curva ROC, no se pudo demostrar que esta enzima tenga valor predictivo en la determinación de la viabilidad de los blastocistos.

Finalmente, se evaluó si el porcentaje de espermatozoides que presentan la APN en su membrana tenía alguna relación con la generación de embriones que finalmente fueron transferidos, criopreservados o descartados. Este análisis mostró que, la presencia de la APN en los espermatozoides no tiene ninguna

relación con el destino final de los embriones que generan. Sin embargo, el valor medio de moléculas de APN por espermatozoide es menor en los embriones que fueron transferidos o criopreservados en comparación con los que finalmente fueron descartados. Esto concuerda con los resultados previos en los que la presencia de un menor número de moléculas de APN en los espermatozoides sería beneficiosa para la formación de embriones de mejor calidad tanto en estadios tempranos como en avanzados, así como para la viabilidad de los blastocistos.

En definitiva, se puede concluir que el porcentaje de espermatozoides positivos para la APN no está relacionado con la calidad de los embriones tempranos, la evolución de los embriones en fases avanzadas del cultivo *in vitro*, la viabilidad de los blastocistos o el destino final de los embriones. Sin embargo, el número medio de moléculas de APN por espermatozoide sí que estaría relacionado con dichas variables, siendo beneficiosa para los embriones la presencia de un menor número de moléculas de APN por espermatozoide. A pesar de ello, no tendría ningún valor predictivo para la diferenciación de blastocistos viables y no viables.

### **4.3. Relación con los resultados de las TRA**

En último lugar, se comprobó si la APN podría ser usada como biomarcador de los resultados de las TRA. Con esta finalidad se relacionaron los porcentajes de espermatozoides que presentaban la APN en su superficie, y el número medio de moléculas de APN por espermatozoide con los parámetros de transferencia embrionaria, embarazo bioquímico, implantación o gestación clínica.

Así, los resultados obtenidos muestran que existe una relación con el porcentaje de espermatozoides que presentan APN en su membrana y la transferencia embrionaria. Siendo mayor el porcentaje de espermatozoides positivos para la APN en los casos en los que hay transferencia. Sin embargo, al analizar este mismo parámetro en relación al número de moléculas de APN, aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas, este valor tiende a ser menor en los casos en los que se ha producido la transferencia. Lo que concuerda con los datos anteriormente mostrados relativos a la evolución, la viabilidad y el destino final de los embriones. Estos datos sugieren, que la presencia de muchos espermatozoides con unas pocas moléculas de APN en su superficie podría ser

beneficiosa para que se produzca la transferencia embrionaria. No obstante, serían necesarios posteriores estudios que ayudasen a comprobar este resultado.

Por otra parte, no se ha hallado ninguna relación con el resto de los parámetros estudiados, de embarazo bioquímico, implantación o gestación clínica. A pesar de saber que el AT4R está implicado en la invasión de las células del TE en el útero materno (Williams *et al.*, 2010). Lo que por ende sugiere, que tanto la Ang IV, péptido que se forma por la acción de la APN, como la propia APN, también serían unas moléculas esenciales en este proceso. No obstante, no se puede negar un posible efecto de esta enzima en dicho parámetros, ya que en todos los casos se transfieren los embriones de mejor calidad, lo que puede suponer un factor de sesgo. Este hecho ha sido previamente observado en otros trabajos (Meseguer *et al.*, 2006), sugiriéndose que para ver estos efectos sería necesario la realización de futuros estudios en los que no se llevase a cabo esa selección embrionaria positiva.

### 5. Discusión general

El RAS, como ya se ha explicado anteriormente, es un sistema molecular que ha sido descrito en los espermatozoides humanos, en los cuales actúa regulando distintas funciones fisiológicas (Vinson *et al.*, 1997; Leung y Sernia, 2003; Paul *et al.*, 2006). Sin embargo, a día de hoy permanecen sin resolverse algunas cuestiones acerca de la presencia y funciones de este sistema en la fisiología espermática. En este trabajo se describe por primera vez la presencia de los receptores AT2R y PRR en los espermatozoides humanos, dejando ver como todos los ejes en los que se divide el RAS, están presentes en estos gametos masculinos (Ganong, 1995; Kohn *et al.*, 1998b; Irazusta *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2010). Así, en la literatura se pueden encontrar múltiples trabajos que relacionan al RAS con la fisiología espermática, participando en procesos tales como la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica, la unión del espermatozoide al oocito y la fecundación (Foresta *et al.*, 1991; Vinson *et al.*, 1996; Gur *et al.*, 1998; Kohn *et al.*, 1995; Togo y Morisawa, 2004; Reis *et al.*, 2010; Subiran *et al.*, 2010). Entre los elementos más investigados destacan las enzimas ACE y APN, las cuales han sido extensamente estudiadas en relación a la fertilidad masculina.

Al igual que estas enzimas participan en la fisiología espermática, en este estudio se ha determinado que todos los componentes del RAS analizados están relacionados con los parámetros seminales básicos de volumen, concentración y movilidad. En cuanto al volumen y la concentración, mientras que el AT2R y la APN se relacionan con ambos parámetros, el PRR y la tACE únicamente se correlacionan con la concentración seminal. Estas correlaciones con el volumen y la concentración también han sido observadas en otras moléculas espermáticas (Irazusta *et al.*, 2004; Martínez-Conejero *et al.*, 2008; Bhilawadikar *et al.*, 2013; Aboutorabi *et al.*, 2014), pudiendo ser debidas, a la calidad seminal y/o a la forma de procesar las muestras para la realización de los tratamientos de fecundación *in vitro*. Por otro lado, todos los elementos del RAS estudiados están asociados con la movilidad espermática, aunque actúan ejerciendo distintos efectos sobre este parámetro. Asimismo, los resultados obtenidos en esta tesis son consistentes con los observados por otros autores en cuanto a la relación de la movilidad con el AT2R (Foresta *et al.*, 1991; Vinson *et al.*, 1996; Kohn *et al.*, 1998a), la tACE (Singh *et al.*, 1985; Kohn *et al.*, 1995), la APN (Subirán *et al.*, 2010), y con otras moléculas espermáticas (Pinto *et al.*, 2010; Bhilawadikar *et al.*, 2013; Siems *et al.*, 1991; Aboutorabi *et al.*, 2014). Así, la actuación conjunta de

todas estas moléculas podría resultar en una regulación mucho más fina de la movilidad, permitiendo un mayor ajuste a los requerimientos espermáticos, ya que estos varían en función del proceso fisiológico que estén llevando a cabo, según su localización en el tracto reproductor femenino (Austin, 1952; Suarez, 2008; Yoshida *et al.*, 2008).

Por otra parte, varios de estos elementos del RAS estudiados también se encuentran implicados en la fisiopatología espermática, lo que resulta evidente al estudiar su relación con las distintas patologías seminales. Concretamente, se ha observado que la presencia del AT2R y los niveles de APN varían en los pacientes astenozoospermicos en comparación con otras etiologías seminales. Estos datos concuerdan con resultados previos, donde vieron que la expresión del AT2R está desregulada en determinados procesos patológicos (Iwai y Horiuchi, 2009), o como la actividad de la APN es menor en pacientes que presentan esta etiología (Irazusta *et al.*, 2004). Sin embargo, mientras que el AT2R podría ser usado como marcador predictivo para diferenciar las muestras de varones astenozoospermicos y normozoospermicos, la APN no posee valor predictivo para la detección de la astenozoospermia. Asimismo, aunque no se observó ninguna relación entre las patologías seminales y la tACE, se vio que las muestras seminales de los pacientes oligozoospermicos tendían a presentar mayores porcentajes de espermatozoides positivos para esta enzima que el resto de pacientes con otras etiologías, lo que coincide con lo observado previamente en otro estudio (Shibahara *et al.*, 2001). Estas diferencias observadas entre las muestras de pacientes a los que se les ha diagnosticado alguna patología seminal junto con las relaciones con los distintos parámetros seminales indicativos de la calidad espermática, permiten ver cómo tanto la presencia del AT2R y de la tACE, como los niveles de APN están relacionados con la fisiopatología espermática.

Durante mucho tiempo se ha venido pensando que la única función del espermatozoide era la de transportar el material genético paterno. Sin embargo, hoy día se sabe que, además del DNA, el espermatozoide aporta una serie de componentes que influyen, tanto en el proceso de fecundación como en el desarrollo del futuro embrión (Sutovsky *et al.*, 1999; Mujica *et al.*, 2003; Miller y Ostermeier, 2006a; Barroso *et al.*, 2009; Meseguer *et al.*, 2011; Garrido *et al.*, 2013; Bhilawadikar *et al.*, 2013). Durante las últimas décadas, se ha venido observando cómo el espermatozoide también aporta al oocito su propio pool de transcritos. Sugiriéndose cada vez con más fuerza, que ese conjunto de RNAs

pueden ejercer distintas funciones esenciales en la fecundación o durante el desarrollo embrionario (Jodar *et al.*, 2013; Miller y Ostermeier, 2006a; Krawetz, 2005a; Garrido *et al.*, 2013). Asimismo, también se ha descrito que el gameto masculino cede al oocito un conjunto de proteínas y moléculas de señalización, que contribuyen tanto en el proceso de activación oocitaria como en los estadios tempranos del desarrollo pronuclear y del desarrollo embrionario (Sutovsky *et al.*, 1999; Mujica *et al.*, 2003; Meseguer *et al.*, 2011; Bhilawadikar *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en esta tesis, refuerzan la idea de que no sólo los transcritos presentes en los espermatozoides intervienen en la fecundación y el desarrollo embrionario, sino que también las proteínas presentes en los gametos masculinos estarían participando de alguna manera en estos procesos.

Los espermatozoides necesitan poseer diferentes características moleculares para la fecundación del oocito dependiendo de si se trata una concepción natural o asistida. Debido a ello cada vez hay más evidencias que relacionan a las proteínas espermáticas con los procesos de fecundación y activación oocitaria (Coonrod *et al.*, 1999; Sutovsky *et al.*, 1999; Inonue *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014; Anifandis *et al.*, 2016). Incluso dependiendo de la TRA usada, ya sea IA, FIV o ICSI, los requerimientos moleculares espermáticos varían, siendo mayores cuanto más se asemeje a la fecundación natural (Garrido *et al.*, 2008; Garrido *et al.*, 2013; Sakkas *et al.*, 2015). En este trabajo, únicamente se ha observado que el AT2R está correlacionado con las tasas de fecundación mediante la técnica de FIV, mientras que ninguno de los demás componentes espermáticos del RAS analizados tendrían valor como biomarcadores de fecundación mediante las técnicas de fecundación *in vitro*.

En relación a la calidad embrionaria, los resultados obtenidos en esta tesis avalan la creciente idea de que las proteínas presentes en los espermatozoides participan de alguna manera en el desarrollo embrionario. Así, se ha determinado que tanto la presencia del AT2R y la tACE, como los niveles de la APN espermáticos influyen en la calidad de los embriones tempranos, mientras que la presencia del PRR y los niveles de tACE y de APN se relacionan con la evolución de los embriones en fases más avanzadas del cultivo *in vitro*. Además, la presencia del AT2R del PRR y los niveles de APN se asocian con la viabilidad de los blastocistos, y únicamente los niveles de APN se asocian con el destino final de los embriones. Todos estos resultados dejan ver como los distintos elementos del RAS analizados en los espermatozoides están de alguna forma

implicados en el desarrollo y viabilidad de los embriones, a pesar de no tener ningún valor como biomarcadores predictivos de estos parámetros. Estos datos apoyan la creciente teoría de que las proteínas presentes en los espermatozoides son capaces de influir en el desarrollo embrionario incluso antes de la activación genética paterna en día 3 (Tesarik *et al.*, 2004; Meseguer *et al.*, 2006; Barroso *et al.*, 2009). No obstante, la presencia de los transcritos de estas proteínas también podría estar influenciando este desarrollo embrionario (Jodar *et al.*, 2013; Miller y Ostermeier, 2006a; Krawetz, 2005a; Garrido *et al.*, 2013).

Finalmente, ninguno de los elementos del RAS analizados posee valor como biomarcadores predictivos de éxito de los resultados de los tratamientos de fecundación *in vitro*. A pesar de ello, la presencia de la APN en los espermatozoides se relaciona con las tasas de transferencia embrionaria, lo que concuerda con el hecho de que la APN presente en espermatozoides estaría influenciando la evolución embrionaria tanto en fases tempranas como en avanzadas del desarrollo, en la viabilidad de los blastocistos como en los embriones que finalmente son transferidos o criopreservados. No obstante, y como se ha relatado previamente, no se puede negar un posible efecto de estos componentes del RAS con la transferencia, el embarazo bioquímico, la implantación o la gestación clínica. Ya que en todos los casos los embriones transferidos fueron los que mejor calidad presentaban de toda la cohorte la embrionaria, lo que supone un factor de sesgo, tal y como también ha sido observado en otros trabajos (Meseguer *et al.*, 2006).

En resumidas cuentas, este trabajo muestra como las proteínas presentes en los espermatozoides, no actúan únicamente regulando la fisiología y fisiopatología espermáticas, sino que también son capaces de influir en el desarrollo embrionario. Además, esta influencia tiene lugar incluso antes de que se produzca la activación de los genes paternos en día 3 de desarrollo embrionario. Igualmente, también reflejan que no sólo es importante estudiar la presencia/ausencia de una determinada proteína, sino que la determinación del número de moléculas de dicha proteína puede aportar una valiosa información. De forma que tanto la evaluación de la presencia/ausencia como la de los niveles proteicos son herramientas útiles, y complementarias, para determinar la función de dicha proteína en las células.

Por otra parte, una característica destacable de los componentes del RAS que han sido analizados en este trabajo, es que son proteínas que se encuentran presentes en la membrana espermática. Esta localización tiene la ventaja de permitir seleccionar los espermatozoides en base a la presencia/ausencia de dichos marcadores, sin que las células sufran ningún tipo de daño. Lo que implica que pueden ser usados como marcadores de selección espermática, al igual que ocurre con otras moléculas espermáticas que se utilizan en la actualidad, como la fosfatidilserina o el ácido hialurónico (Grunewald, 2001; Said y Land, 2011; Nasr-Esfahani *et al.*, 2008; Huszar *et al.*, 2007).

Por lo que estos datos, abren una nueva puerta en la investigación de la fertilidad espermática. Asimismo, reflejan la necesidad de mejorar las técnicas de selección de los espermatozoides que van a ser usados en las distintas TRA, ya que una buena selección en base a estas características espermáticas resulta vital para la mejora de los resultados de los tratamientos de infertilidad, ahorrando costes y evitando problemas derivados de estas técnicas como los embarazos múltiples.





## **VI. CONCLUSIONES**



1. Los receptores AT2R y PRR están presentes en los espermatozoides humanos tanto a nivel génico, como proteico.
  - 1.1. El AT2R está presente en aproximadamente el 80% de los espermatozoides analizados, localizándose en el segmento ecuatorial/postacrosomal de la cabeza espermática.
  - 1.2. El PRR está presente en aproximadamente el 70% de los espermatozoides analizados, localizándose en la parte frontal de la cabeza sobre la región acrosómica y en la parte posterior de la cabeza espermática y en menor medida a lo largo de la cola.
2. Los distintos elementos del RAS analizados se correlacionan con los parámetros seminales básicos de volumen, concentración y movilidad de las muestras seminales en fresco y tras ser procesadas. Sin embargo, solamente el porcentaje de células que expresan el AT2R y los niveles de APN en los espermatozoides se asocian con las distintas etiologías seminales.
  - 2.1. Tanto el porcentaje de espermatozoides que expresan el AT2R y la APN, como los niveles de esta enzima por espermatozoide se correlacionan con el volumen seminal.
    - 2.1.1. Los niveles de tACE por espermatozoide se correlacionan positivamente con el volumen seminal de las muestras en fresco, mientras que el porcentaje de espermatozoides que expresan la APN se correlacionan de forma negativa con este parámetro, también en las muestras en fresco.
    - 2.1.2. El porcentaje de espermatozoides que expresan el AT2R y la APN se correlacionan de forma positiva con el volumen seminal de las muestras tras ser procesadas.
  - 2.2. Todos los elementos del RAS analizados en los espermatozoides se correlacionan con la concentración de las muestras seminales.
    - 2.2.1. El porcentaje de espermatozoides que expresan el AT2R se correlacionan de forma positiva con la concentración de las muestras seminales en fresco y tras ser procesadas.

- 2.2.2. El porcentaje de estas células que expresan el PRR y los niveles de tACE y de APN por espermatozoide se correlacionan de forma negativa con la concentración de las muestras procesadas.
- 2.2.3. El porcentaje de espermatozoides que expresan la APN se correlacionan de forma positiva con la concentración de las muestras procesadas.
- 2.3. Todos los elementos del RAS analizados en los espermatozoides se correlacionan con la movilidad espermática.
  - 2.3.1. El porcentaje de espermatozoides que expresan el AT2R se correlacionan positivamente con la movilidad espermática tanto en las muestras en fresco, como tras ser procesadas.
  - 2.3.2. El porcentaje de espermatozoides que expresan el PRR se correlaciona positivamente con el porcentaje de espermatozoides con movilidad no progresiva de las muestras procesadas.
  - 2.3.3. El porcentaje de espermatozoides que expresan la tACE se correlacionan de forma negativa con la movilidad espermática de las muestras en fresco, y mientras que los niveles de tACE por espermatozoide se correlaciona también negativamente con la movilidad de las muestras tras ser procesadas.
  - 2.3.4. El porcentaje de espermatozoides que expresan la APN y los niveles de esta enzima por espermatozoide se relacionan de forma positiva con la movilidad de las muestras en fresco, mientras que tras ser procesadas únicamente los niveles de APN se correlacionan de forma negativa con este parámetro.
- 2.4. El porcentaje de espermatozoides que presentan el AT2R en su superficie y los niveles de APN en estas células, son menores en varones astenozoospermicos. Pero mientras que el porcentaje de espermatozoides que expresan el AT2R posee valor predictivo para diferenciar muestras de pacientes normozoospermicos de astenozoospermicos, los niveles de APN por espermatozoide no poseen ningún valor predictivo de esta etiología seminal.

3. Los distintos elementos del RAS analizados en los espermatozoides están asociados con el desarrollo embrionario tanto temprano como avanzado.
  - 3.1. El porcentaje de células que expresan el AT2R se relaciona con las tasas de fecundación mediante la técnica de FIV, mientras que el porcentaje de estas células que expresan el PRR, la tACE y la APN, o los niveles de estas enzimas por espermatozoide, no tienen ninguna relación con las tasas de fecundación tras el uso de técnicas de fecundación *in vitro*.
  - 3.2. El porcentaje de células que expresan el AT2R y los niveles de APN por espermatozoide influyen negativamente en la calidad de los embriones tempranos en D+2 y D+3, mientras que la presencia de la tACE en los gametos masculinos influye de forma positiva en la calidad de dichos embriones.
  - 3.3. El porcentaje de células que expresan el PRR y los niveles de tACE y de APN por espermatozoide se relacionan de forma negativa con la evolución de los embriones en las fases más avanzadas del cultivo *in vitro*.
  - 3.4. El porcentaje del AT2R espermático se relaciona de forma positiva con la viabilidad de los blastocistos, mientras que la presencia del PRR en estas células y los niveles de APN por espermatozoide se asocian negativamente. A pesar de estas relaciones, ninguno de estos elementos del RAS poseen valor predictivo para la determinación de la viabilidad de los blastocistos.
  - 3.5. Los niveles de APN por espermatozoide se asocian con el destino final de los embriones, siendo beneficiosa la presencia de un menor número de moléculas de esta enzima.
4. Ninguno de los elementos del RAS analizados en los espermatozoides se relacionan con los resultados de éxito tras la realización de los tratamientos de fecundación *in vitro*.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



---

## BIBLIOGRAFÍA

Abdalla HI, Wren ME, Thomas A and Korea L. Age of the uterus does not affect pregnancy or implantation rates; a study of egg donation in women of different ages sharing oocytes from the same donor. *Hum Reprod* 1997;12:827-829.

Abou-Haila A and Tulsiani DR. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 2000;379:173-182.

Aboutorabi R, Mazani F and Rafiee L. Evaluation of CD52 positive sperms in subfertile human semen samples: Is there any relationship with main semen parameters?. *Adv Biomed Res* 2014;3:124-9175.133201. eCollection 2014.

Agarwal A and Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 2005;95:503-507.

Agarwal A, Virk G, Ong C and du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 2014;32:1-17.

Agirregoitia E, Carracedo A, Subiran N, Valdivia A, Agirregoitia N, Peralta L, Velasco G and Irazusta J. The CB(2) cannabinoid receptor regulates human sperm cell motility. *Fertil Steril* 2010;93:1378-1387.

Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subiran N, Ochoa C and Irazusta J. Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4969-4975.

Agrawal Y and Vanha-Perttula T. Variable distribution of aminopeptidase A in male reproductive organs of mammals. *Int J Androl* 1985;8:243-256.

Aguilar C, Meseguer M, Garcia-Herrero S, Gil-Salom M, O'Connor JE and Garrido N. Relevance of testicular sperm DNA oxidation for the outcome of ovum donation cycles. *Fertil Steril* 2010;94:979-988.

Ainsworth C, Nixon B and Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20:2261-2270.

Aitken RJ and Baker MA. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol* 2013;57:265-272.

Aitken RJ and Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988;9:367-376.

Aitken RJ and Curry BJ. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:367-381.

Aitken RJ and Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 2011;13:36-42.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z and Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59:1037-1046.

Aitken RJ, Nixon B, Lin M, Koppers AJ, Lee YH and Baker MA. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl* 2007;9:554-564.

Alam P and Remohí JA. Analisis de la Evolución de los Estudios y Tratamientos de la Infertilidad. In Matorras R, Coroleu B, Romeu A and Pérez F (eds) Libro Blanco Sociosanitario. "La infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas". 2011. Imago Concept & Image Development, S.L., Madrid, pp. 43-52.

Alberts B. *Biología Molecular de la Célula*. 5<sup>a</sup> edn, 2010. Omega.

Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM et al. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 2001;276:48623-48626.

Alenina N, Baranova T, Smirnow E, Bader M, Lippoldt A, Patkin E and Walther T. Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. *J Histochem Cytochem* 2002;50:691-696.

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M and Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod* 2000;15:2634-2643.

Almeida C, Sousa M and Barros A. Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2009;19:770-777.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26:1270-1283.

Amann RP and Howards SS. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *J Urol* 1980;124:211-215.

Amdani SN, Jones C and Coward K. Phospholipase C zeta (PLCzeta): oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Adv Biol Regul* 2013;53:292-308.

Anifandis G, Bounartzi T, Messini CI, Dafopoulos K, Markandona R, Sotiriou S, Tzavella A and Messinis IE. Sperm DNA fragmentation measured by Halosperm does not impact on embryo quality and ongoing pregnancy rates in IVF/ICSI treatments. *Andrologia* 2015;47:295-302.

Anifandis G, Messini CI, Dafopoulos K, Daponte A and Messinis IE. Sperm contributions to oocyte activation: more that meets the eye. *J Assist Reprod Genet* 2016:.

- Antczak C, De Meester I and Bauvois B. Transmembrane proteases as disease markers and targets for therapy. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001;15:130-139.
- ASEBIR. Cuadernos de Embriología Clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2º edn, 2008. Góbaló, Madrid.
- ASEBIR. Cuadernos de Embriología Clínica. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 3º edn, 2015. Góbaló, Madrid.
- Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007;13:9-20.
- Auger J and Jouannet P. Age and male fertility: biological factors. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2005;53 Spec No 2:2S25-35.
- Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 1952;170:326.
- Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004;36:333-339.
- Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC and Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med (Berl)* 2001;79:76-102.
- Balaban B and Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006;12:608-615.
- Balaban B, Sakkas D and Gardner DK. Laboratory procedures for human in vitro fertilization. *Semin Reprod Med* 2014;32:272-282.
- Balakumar P and Jagadeesh G. Potential cross-talk between (pro)renin receptors and Wnt/frizzled receptors in cardiovascular and renal disorders. *Hypertens Res* 2011;34:1161-1170.
- Bansal SK, Gupta N, Sankhwar SN and Rajender S. Differential Genes Expression between Fertile and Infertile Spermatozoa Revealed by Transcriptome Analysis. *PLoS One* 2015;10:e0127007.
- Barroso G, Morshedi M and Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1338-1344.
- Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendano C and Oehninger S. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril* 2009;92:835-848.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M and Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003;80:1413-1419.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y and Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002;23:1-8.

## Bibliografía

---

Bellver J, Garrido N, Remohi J, Pellicer A and Meseguer M. Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. *Reprod Biomed Online* 2008;17:595-604.

Bendvold E. Semen quality in Norwegian men over a 20-year period. *Int J Fertil* 1989;34:401-404.

Bernstein KE, Martin BM, Edwards AS and Bernstein EA. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J Biol Chem* 1989;264:11945-11951.

Bhilawadikar R, Zaveri K, Mukadam L, Naik S, Kamble K, Modi D and Hinduja I. Levels of Tektin 2 and CatSper 2 in normozoospermic and oligoasthenozoospermic men and its association with motility, fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:513-523.

Binger KJ and Muller DN. Autophagy and the (Pro)renin Receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:155.

Blanco L, Larrinaga G, Perez I, Lopez JI, Gil J, Agirregoitia E and Varona A. Acid, basic, and neutral peptidases present different profiles in chromophobe renal cell carcinoma and in oncocytoma. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F850-8.

Bodri D, Colodron M, Vidal R, Galindo A, Durban M and Coll O. Prognostic factors in oocyte donation: an analysis through egg-sharing recipient pairs showing a discordant outcome. *Fertil Steril* 2007;88:1548-1553.

Boivin J, Bunting L, Collins JA and Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007;22:1506-1512.

Bonvouloir N, Lemieux N, Crine P, Boileau G and DesGroseillers L. Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of MMEL2, a gene coding for a novel human member of the neutral endopeptidase-24.11 family. *DNA Cell Biol* 2001;20:493-498.

Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* 2002;187:139-144.

Brentjens JR, Matsuo S, Andres GA, Caldwell PR and Zamboni L. Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). *Experientia* 1986;42:399-402.

Calamita G, Mazzone A, Cho YS, Valenti G and Svelto M. Expression and localization of the aquaporin-8 water channel in rat testis. *Biol Reprod* 2001;64:1660-1666.

Calogero AE, Burrello N, Ferrara E, Hall J, Fishel S and D'Agata R.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) a and b receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone. *Fertil Steril* 1999;71:930-936.

Carpentier M, Guillemette C, Bailey JL, Boileau G, Jeannotte L, DesGroseillers L and Charron J. Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1. *Mol Cell Biol* 2004;24:4428-4437.

Carrell DT, Emery BR and Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?. *Hum Reprod Update* 2007;13:313-327.

Castillo J, Amaral A, Azpiazu R, Vavouri T, Estanyol JM, Ballesca JL and Oliva R. Genomic and proteomic dissection and characterization of the human sperm chromatin. *Mol Hum Reprod* 2014;20:1041-1053.

Castillo J, Simon L, de Mateo S, Lewis S and Oliva R. Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *J Androl* 2011;32:324-332.

Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA and Albiston AL. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2728-2737.

Chalbi M, Barraud-Lange V, Ravoux B, Howan K, Rodriguez N, Soule P, Ndzoudi A, Boucheix C, Rubinstein E, Wolf JP et al. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development* 2014;141:3732-3739.

Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU and Patton WC. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertil Steril* 2006;85:481-486.

Chan SY, Tucker MJ, Leung CK and Leong MK. Association between human in vitro fertilization rate and pregnancy outcome: a possible involvement of spermatozoal quality in subsequent embryonic viability. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1993;19:357-373.

Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951;168:697-698.

Chappell MC. Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Compr Physiol* 2012;2:2733-2752.

Chemes HE and Alvarez Sedo C. Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J Androl* 2012;14:14-23.

Cherr GN, Yudin AI, Li MW, Vines CA and Overstreet JW. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *Zygote* 1999;7:211-222.

Clavreul N, Sansilvestri-Morel P, Magard D, Verbeuren TJ and Rupin A. (Pro)renin promotes fibrosis gene expression in HEK cells through a Nox4-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300:F1310-8.

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972;52:198-236.

Codina M, Estanyol JM, Fidalgo MJ, Ballesca JL and Oliva R. Advances in sperm proteomics: best-practise methodology and clinical potential. *Expert Rev Proteomics* 2015;12:255-277.

## Bibliografía

---

- Collins JA. Evidence-based infertility: evaluation of the female partner. *Int Congr Ser* 2004;1266:57-62.
- Coonrod S, Naaby-Hansen S, Shetty J and Herr J. PI-PLC releases a 25-40 kDa protein cluster from the hamster oolemma and affects the sperm penetration assay. *Mol Hum Reprod* 1999;5:1027-1033.
- Craven DJ, Warren AY and Symonds EM. Active and inactive renin in human seminal plasma. *Arch Androl* 1981;7:63-67.
- Crowley SD and Coffman TM. Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Exp Cell Res* 2012;318:1049-1056.
- Cushman DW and Cheung HS. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1971;250:261-265.
- de Gasparo M and Siragy HM. The AT<sub>2</sub> receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul Pept* 1999;81:11-24.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW and Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:415-472.
- De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 2005;11:205-214.
- De Jonge C. The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. *Hum Fertil (Camb)* 2002;5:51-53.
- de la Chica-Rodriguez S, Cortes-Denia P, Ramirez-Exposito MJ, de Saavedra JM, Sanchez-Agesta R, Perez Mdel C and Martinez-Martos JM. In vivo administration of doxazosin in rats highly decreases serum circulating levels of testosterone through a mechanism involving the testicular renin-angiotensin system. *Int J Androl* 2008;31:364-370.
- de Lamirande E, Leclerc P and Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 1997;3:175-194.
- de Lamirande E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:60-68.
- Deepinder F, Chowdary HT and Agarwal A. Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. *Expert Rev Mol Diagn* 2007;7:351-358.
- Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, Camsari C, Kanyilmaz O, Kaya A and Unsal A. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:375-381.
- Dobrinski I, Ignatz GG, Fagnan MS, Yudin SI and Ball BA. Isolation and characterization of a protein with homology to angiotensin converting enzyme from the periacrosomal plasma membrane of equine spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1997;48:251-260.
- Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W and EAU Working Group on Male Infertility. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 2005;48:703-711.

Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, Mottier S, Edeline J, Moranne O, Le Pogamp P, Belaud-Rotureau MA, Patard JJ, Rioux-Leclercq N et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma?. *Br J Cancer* 2010;103:1698-1705.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000;87:E1-9.

Dzau VJ, Ellison KE, Brody T, Ingelfinger J and Pratt RE. A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology* 1987;120:2334-2338.

Edwards DR, Handsley MM and Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 2008;29:258-289.

Egea RR, Puchalt NG, Escriva MM and Varghese AC. OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *J Hum Reprod Sci* 2014;7:73-92.

Ehlers MR, Fox EA, Strydom DJ and Riordan JF. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:7741-7745.

El-Dorry HA, MacGregor JS and Soffer RL. Dipeptidyl carboxypeptidase from seminal fluid resembles the pulmonary rather than the testicular isoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;115:1096-1100.

Engelmann U, Krassnigg F, Schatz H and Schill WB. Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. *Gamete Res* 1988;19:151-160.

Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, Garrido N and Calderon G. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:704-710.

ESHRE. 2014:2016.:<https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/ART-fact-sheet.aspx>.

Esther CR,Jr, Howard TE, Marino EM, Goddard JM, Capecchi MR and Bernstein KE. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 1996;74:953-965.

Evenson DP, Larson KL and Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.

Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev* 1999;11:1-15.

## Bibliografía

---

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL and Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.

Farquhar C, Rishworth JR, Brown J, Nelen WL and Marjoribanks J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;12:CD010537.

Fernandez D, Valdivia A, Irazusta J, Ochoa C and Casis L. Peptidase activities in human semen. *Peptides* 2002;23:461-468.

Foresta C, Indino M, Manoni F and Scandellari C. Angiotensin-converting enzyme content of human spermatozoa and its release during capacitation. *Fertil Steril* 1987;47:1000-1003.

Foresta C, Mioni R, Rossato M, Varotto A and Zorzi M. Evidence for the involvement of sperm angiotensin converting enzyme in fertilization. *Int J Androl* 1991;14:333-339.

Fournier D, Luft FC, Bader M, Ganten D and Andrade-Navarro MA. Emergence and evolution of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Mol Med (Berl)* 2012;90:495-508.

Fraczek M and Kurpisz M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005;59:523-534.

Francavilla S, Gabriele A, Romano R, Gianaroli L, Ferraretti AP and Francavilla F. Sperm-zona pellucida binding of human sperm is correlated with the immunocytochemical presence of proacrosin and acrosin in the sperm heads but not with the proteolytic activity of acrosin. *Fertil Steril* 1994;62:1226-1233.

Francavilla S, Palermo G, Gabriele A, Cordeschi G and Poccia G. Sperm acrosin activity and fluorescence microscopic assessment of proacrosin/acrosin in ejaculates of infertile and fertile men. *Fertil Steril* 1992;57:1311-1316.

Francis S, Yelumalai S, Jones C and Coward K. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum Fertil (Camb)* 2014;17:80-89.

Franke FE, Pauls K, Metzger R and Danilov SM. Angiotensin I-converting enzyme and potential substrates in human testis and testicular tumours. *APMIS* 2003;111:234-43; discussion 243-4.

Frydman N, Prisant N, Hesters L, Frydman R, Tachdjian G, Cohen-Bacrie P and Fanchin R. Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2008;89:92-97.

Fuchs S, Frenzel K, Hubert C, Lyng R, Muller L, Michaud A, Xiao HD, Adams JW, Capecchi MR, Corvol P et al. Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE. *Nat Med* 2005;11:1140-2; author reply 1142-3.

Fyhrquist F and Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008;264:224-236.

Gafford JT, Skidgel RA, Erdos EG and Hersh LB. Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry* 1983;22:3265-3271.

Ganong WF. Reproduction and the renin-angiotensin system. *Neurosci Biobehav Rev* 1995;19:241-250.

Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A and Meseguer M. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* 2011;22:25-36.

Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A and Meseguer M. Ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis. *J Assist Reprod Genet* 2010a;27:111-120.

Garcia-Herrero S, Meseguer M, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A and Garrido N. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril* 2010b;94:1360-1373.

Garrido N, Garcia-Herrero S and Meseguer M. Assessment of sperm using mRNA microarray technology. *Fertil Steril* 2013;99:1008-1022.

Garrido N, Meseguer M, Alvarez J, Simon C, Pellicer A and Remohi J. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2004;82 Suppl 3:1059-1066.

Garrido N, Remohi J, Martinez-Conejero JA, Garcia-Herrero S, Pellicer A and Meseguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online* 2008;17:855-865.

Garrido N. Presente y futuro de la evaluación del semen con finalidad reproductiva en un centro de reproducción asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana* 2014;31:10-20.

George AJ, Thomas WG and Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer* 2010;10:745-759.

Ghaddar G, Ruchon AF, Carpentier M, Marcinkiewicz M, Seidah NG, Crine P, Desgroseillers L and Boileau G. Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family. *Biochem J* 2000;347:419-429.

Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP and Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril* 2008;90:104-112.

Gibbons R, Adeoya-Osiguwa SA and Fraser LR. A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolamine-binding protein 1. *Reproduction* 2005;130:497-508.

Gil M, Sar-Shalom V, Melendez Sivira Y, Carreras R and Checa MA. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:479-485.

Gilany K, Minai-Tehrani A, Savadi-Shiraz E, Rezadoost H and Lakpour N. Exploring the human seminal plasma proteome: an unexplored gold mine of biomarker for male infertility and male reproduction disorder. *J Reprod Infertil* 2015;16:61-71.

Glujovsky D, Blake D, Farquhar C and Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;7:CD002118.

Goto M, O'Brien DA and Eddy EM. Speriolin is a novel human and mouse sperm centrosome protein. *Hum Reprod* 2010;25:1884-1894.

Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S and Khochbin S. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 2004;271:3459-3469.

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

Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ, Toner JP, Swanson RJ, Kruger TF and Muasher SJ. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil Steril* 1994;62:559-567.

Grunewald S, Paasch U and Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001;2:127-133.

Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Said TM, Agarwal A, Abu Hmeidan F, Glander HJ and Paasch U. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril* 2009;92:572-577.

Gupta P, Franco-Saenz R and Mulrow PJ. Locally generated angiotensin II in the adrenal gland regulates basal, corticotropin-, and potassium-stimulated aldosterone secretion. *Hypertension* 1995;25:443-448.

Gur Y, Breitbart H, Lax Y, Rubinstein S and Zamir N. Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am J Physiol* 1998;275:E87-93.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388-1393.

Hafez ES, Goff L and Hafez B. Mammalian fertilization, IVF, ICSI: physiological/molecular parameters, clinical application. *Arch Androl* 2004;50:69-88.

Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH and O'Brien DA. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2552-2557.

Hardy K, Spanos S, Becker D, Iannelli P, Winston RM and Stark J. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1655-1660.

Hayasaka S, Terada Y, Inoue N, Okabe M, Yaegashi N and Okamura K. Positive expression of the immunoglobulin superfamily protein IZUMO on human sperm of severely infertile male patients. *Fertil Steril* 2007;88:214-216.

Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl* 2012;14:260-269.

Henricks DM1, Kouba AJ, Lackey BR, Boone WR, Gray SL. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biology of Reproduction* 1998;59:330-337.

Herr D, Bekes I and Wulff C. Local Renin-Angiotensin system in the reproductive system. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:150.

Hertting G and Meyer DK. Effect of converting enzyme blockade on isoprenaline- and angiotensin I-induced drinking. *Br J Pharmacol* 1974;52:381-386.

Hinchcliffe EH and Linck RW. Two proteins isolated from sea urchin sperm flagella: structural components common to the stable microtubules of axonemes and centrioles. *J Cell Sci* 1998;111 ( Pt 5):585-595.

Hirai K, Song K, Kanehara H, Shiota N, Ueda H, Kim S, Miyazaki H, Katsuoka Y and Miyazaki M. Pituitary-dependent expression of the testicular angiotensin II receptor and its subtypes in rats. *Int J Androl* 1998;21:177-185.

Hirayama T, Hasegawa T and Hiroi M. The measurement of hyaluronidase activity in human spermatozoa by substrate slide assay and its clinical application. *Fertil Steril* 1989;51:330-334.

Hohlbrugger G, Pschorr J and Dahlheim H. Angiotensin I converting enzyme in the ejaculate of fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1984;41:324-325.

Homa ST, Vessey W, Perez-Miranda A, Riyait T and Agarwal A. Reactive Oxygen Species (ROS) in human semen: determination of a reference range. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:757-764.

Hooft van Huijsduijnen R. ADAM 20 and 21; two novel human testis-specific membrane metalloproteases with similarity to fertilin-alpha. *Gene* 1998;206:273-282.

Howard TE, Shai SY, Langford KG, Martin BM and Bernstein KE. Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol Cell Biol* 1990;10:4294-4302.

## Bibliografía

---

Hubert C, Houot AM, Corvol P and Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991;266:15377-15383.

Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E and Ozkavukcu S. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007;14:650-663.

Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ and Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997;56:1020-1024.

Inoue N, Ikawa M, Isotani A and Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005;434:234-238.

Inoue N, Yamaguchi R, Ikawa M and Okabe M. Sperm-egg interaction and gene manipulated animals. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;65:363-371.

Inoue T, Kanzaki H, Imai K, Narukawa S, Higuchi T, Katsuragawa H, Maeda M and Mori T. Bestatin, a potent aminopeptidase-N inhibitor, inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:171-175.

Intasqui P, Antoniassi MP, Camargo M, Nichi M, Carvalho VM, Cardozo KH, Zylbersztejn DS and Bertolla RP. Differences in the seminal plasma proteome are associated with oxidative stress levels in men with normal semen parameters. *Fertil Steril* 2015:.

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

Ishijima SA, Okuno M and Mohri H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *Int J Androl* 1991;14:340-347.

Isobe T, Minoura H, Tanaka K, Shibahara T, Hayashi N and Toyoda N. The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod* 2002;17:1441-1446.

Iwai M and Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res* 2009;32:533-536.

Jacob A, Hurley I, Mandel FS, Hershlag A, Cooper GW and Benoff S. Human sperm non-nuclear progesterone receptor expression is a novel marker for fertilization outcome. *Mol Hum Reprod* 1998;4:533-542.

Jaiswal AK, Panda JN, Kumar MV and Singh LN. Age related development of angiotensin converting enzyme in testes and epididymis of rat. *Andrologia* 1983;15:347-349.

Ji G, Gu A, Wang Y, Huang C, Hu F, Zhou Y, Song L and Wang X. Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population. *Free Radic Biol Med* 2012;52:775-780.

Jodar M, Selvaraju S, Sendler E, Diamond MP, Krawetz SA and Reproductive Medicine Network. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum Reprod Update* 2013;19:604-624.

Jodar M, Sendler E and Krawetz SA. The protein and transcript profiles of human semen. *Cell Tissue Res* 2016;363:85-96.

Jung K, Pergande M and Wischke UW. Characterization of particulate and soluble variants of the brush-border enzymes alanine aminopeptidase, alkaline phosphatase and gamma-glutamyltransferase in human urine. *Biomed Biochim Acta* 1984;43:1357-1364.

Jurewicz M, McDermott DH, Sechler JM, Tinckam K, Takakura A, Carpenter CB, Milford E and Abdi R. Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1093-1102.

Kamata M, Hu J, Shibahara H and Nakagawa H. Assay of testicular angiotensin-converting enzyme activity in human spermatozoa. *Int J Androl* 2001;24:225-231.

Kasai H, Hayami H, Yamaizumi Z, Saito H and Nishimura S. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic Acids Res* 1984;12:2127-2136.

Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387:147-163.

Kashir J, Nomikos M, Swann K and Lai FA. PLCzeta or PAWP: revisiting the putative mammalian sperm factor that triggers egg activation and embryogenesis. *Mol Hum Reprod* 2015;21:383-388.

Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002;181-182:471-474.

Khanum A and Dufau ML. Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *J Biol Chem* 1988;263:5070-5074.

Khorram O, Patrizio P, Wang C and Swerdloff R. Reproductive technologies for male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2373-2379.

Khosrowbeygi A and Zarghami N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007;77:117-121.

Kierszenbaum AL and Tres L. *Histología y Biología Celular. Introducción a la Anatomía Patológica*. 3ª edn, 2012. Elsevier, Barcelona.

## Bibliografía

---

Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev* 2001;58:357-358.

Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R and Hiwada K. Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:446-452.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG and Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 2007;59:251-287.

Kohn FM, Dammshauer I, Neukamm C, Renneberg H, Siems WE, Schill WB and Aumuller G. Ultrastructural localization of angiotensin-converting enzyme in ejaculated human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998b;13:604-610.

Kohn FM, Miska W and Schill WB. Release of angiotensin-converting enzyme (ACE) from human spermatozoa during capacitation and acrosome reaction. *J Androl* 1995;16:259-265.

Kohn FM, Muller C, Drescher D, Neukamm C, el Mulla KF, Henkel R, Hagele W, Hinsch E, Habenicht UF and Schill WB. Effect of angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensins on human sperm functions. *Andrologia* 1998a;30:207-215.

Kovac JR, Pastuszak AW and Lamb DJ. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril* 2013;99:998-1007.

Krawetz SA. On the significance of RNA in human sperm. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2005a;11:170-174.

Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet* 2005b;6:633-642.

Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgin JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA and Smithies O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 1995;375:146-148.

Kruger TF and Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 1999;5:172-178.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF and Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;49:112-117.

Kumar R, Singh VP and Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:208-214.

Kumar RS, Thekkumkara TJ and Sen GC. The mRNAs encoding the two angiotensin-converting isozymes are transcribed from the same gene by a tissue-specific choice of alternative transcription initiation sites. *J Biol Chem* 1991;266:3854-3862.

Kurdi M, Mello WCD and Booz GW. Working outside the system: an update on the unconventional behavior of the renin–angiotensin system components. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1357-1367.

La Sala GB, Nicoli A, Fornaciari E, Falbo A, Rondini I, Morini D, Valli B, Villani MT and Palomba S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection versus conventional intracytoplasmic sperm injection: a randomized controlled trial. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:97-015-0096-y.

Lalancette C, Miller D, Li Y and Krawetz SA. Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem* 2008;104:1570-1579.

Lalancette C, Platts AE, Johnson GD, Emery BR, Carrell DT and Krawetz SA. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J Mol Med (Berl)* 2009;87:735-748.

Langford KG, Shai SY, Howard TE, Kovac MJ, Overbeek PA and Bernstein KE. Transgenic mice demonstrate a testis-specific promoter for angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 1991;266:15559-15562.

Lattion AL, Soubrier F, Allegrini J, Hubert C, Corvol P and Alhenc-Gelas F. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett* 1989;252:99-104.

Leal MC, Pinheiro SV, Ferreira AJ, Santos RA, Bordoni LS, Alenina N, Bader M and Franca LR. The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. *J Anat* 2009;214:736-743.

Lee CY, Ho J, Chow SN, Yasojima K, Schwab C and McGeer PL. Immunoidentification of gonadotropin releasing hormone receptor in human sperm, pituitary and cancer cells. *Am J Reprod Immunol* 2000;44:170-177.

Lee LK and Foo KY. Recent insights on the significance of transcriptomic and metabolomic analysis of male factor infertility. *Clin Biochem* 2014;47:973-982.

Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JB, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, Jongeneel CV and McInnes RR. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 1988;168:1247-1253.

Leung PS and Carlsson PO. Pancreatic islet renin angiotensin system: its novel roles in islet function and in diabetes mellitus. *Pancreas* 2005;30:293-298.

Leung PS and Sernia C. The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones. *J Mol Endocrinol* 2003;30:263-270.

Leung PS, Chan HC, Fu LX, Zhou WL and Wong PY. Angiotensin II receptors, AT1 and AT2 in the rat epididymis. Immunocytochemical and electrophysiological studies. *Biochim Biophys Acta* 1997;1357:65-72.

Levy BI. Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation* 2004;109:8-13.

## Bibliografía

---

Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ES, Kennedy MS, Thompson W and Chakravarthy U. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod* 1996;2:873-878.

Lewis SE. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?. *Reproduction* 2007;134:31-40.

Ley 14/2006. Ley 14/2006, de 26 de Mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. [http://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=-BOE-A-2006-9292](http://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=-BOE-A-2006-9292), Gobierno de España. Boletín Oficial del Estado (BOE). 2006. Número 126:19947-56.

Li LJ, Zhang FB, Liu SY, Tian YH, Le F, Wang LY, Lou HY, Xu XR, Huang HF and Jin F. Human sperm devoid of germinal angiotensin-converting enzyme is responsible for total fertilization failure and lower fertilization rates by conventional in vitro fertilization. *Biol Reprod* 2014;90:125.

Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH and Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest* 1989;83:1299-1307.

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J and Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69:528-532.

Machtiger R and Racowsky C. Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reprod Biomed Online* 2013;26:210-221.

MacKenzie SM, Fraser R, Connell JM and Davies E. Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal corticosteroid production. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2002;3:214-221.

Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abuzenadah AM and Abu-Elmagd M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:121-7827-12-121.

Mantikou E, Youssef MA, van Wely M, van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S and Mastenbroek S. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2013;19:210-220.

Martinez-Conejero JA, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Simon C and Meseguer M. MUC1 in human testis and ejaculated spermatozoa and its relationship to male fertility status. *Fertil Steril* 2008;90:450-452.

Martinez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Balleca JL and Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod* 2008;23:783-791.

Martinez-Martos JM, Arrazola M, Mayas MD, Carrera-Gonzalez MP, Garcia MJ and Ramirez-Exposito MJ. Diet-induced hypercholesterolemia impaired testicular steroidogenesis in mice through the renin-angiotensin system. *Gen Comp Endocrinol* 2011;173:15-19.

Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S and Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012;9:e1001356.

Matorras R and Crisol L. Fertilidad e Infertilidad Humanas. In Matorras R, Coroleu B, Romeu A and Pérez F (eds) Libro Blanco Sociosanitario. "La infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas". 2011. Imago Concept & Image Development, S.L., Madrid, pp. 31-42.

Matorras R and Hernández J. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción. 2007. Adalia, Madrid.

Matsas R, Turner AJ and Kenny AJ. Endopeptidase-24.11 and aminopeptidase activity in brain synaptic membranes are jointly responsible for the hydrolysis of cholecystokinin octapeptide (CCK-8). *FEBS Lett* 1984;175:124-128.

McDowell S, Kroon B, Ford E, Hook Y, Glujovsky D and Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;10:CD010461.

McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FA and Chai SY. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:901-918.

Menezó Y, Dale B and Cohen M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote* 2010;18:357-365.

Meseguer M, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J and Garrido N. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2006;86:1376-1385.

Meseguer M, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Simon C, Pellicer A and Remohi J. Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:445-451.

Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohi J and Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril* 2008;89:1191-1199.

Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohi J and Fernández JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2011;95:124-128.

Miller D and Ostermeier GC. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do?. *Gynecol Obstet Fertil* 2006a;34:840-846.

Miller D and Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update* 2006b;12:757-767.

## Bibliografía

---

Miller D, Ostermeier GC and Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med* 2005;11:156-163.

Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med* 2008;14:361-371.

Modelski MJ, Menlah G, Wang Y, Dash S, Wu K, Galileo DS and Martin-DeLeon PA. Hyaluronidase 2: a novel germ cell hyaluronidase with epididymal expression and functional roles in mammalian sperm. *Biol Reprod* 2014;91:109.

Moeller I, Small DH, Reed G, Harding JW, Mendelsohn FA and Chai SY. Angiotensin IV inhibits neurite outgrowth in cultured embryonic chicken sympathetic neurones. *Brain Res* 1996;725:61-66.

Monsees TK, Gornig M, Schill WB and Miska W. Possible involvement of proteases in the regulation of spermatogenesis. *Andrologia* 1998;30:185-191.

Morse HC, Horike N, Rowley MJ and Heller CG. Testosterone concentrations in testes of normal men: effects of testosterone propionate administration. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;37:882-886.

Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, Jr and Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004;19:129-138.

Muciaccia B, Padula F, Vicini E, Gandini L, Lenzi A and Stefanini M. Beta-chemokine receptors 5 and 3 are expressed on the head region of human spermatozoon. *FASEB J* 2005;19:2048-2050.

Mujica A, Navarro-Garcia F, Hernandez-Gonzalez EO and De Lourdes Juarez-Mosqueda M. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microsc Res Tech* 2003;61:76-87.

Mukhopadhyay AK, Cobilanschi J, Schulze W, Brunswig-Spickenheier B and Leidenberger FA. Human seminal fluid contains significant quantities of prorenin: its correlation with the sperm density. *Mol Cell Endocrinol* 1995;109:219-224.

Mulrow PJ. Renin-angiotensin system in the adrenal. *Horm Metab Res* 1998;30:346-349.

Muratori M, Luconi M, Marchiani S, Forti G and Baldi E. Molecular markers of human sperm functions. *Int J Androl* 2009;32:25-45.

Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G, Luconi M and Baldi E. Markers of human sperm functions in the ICSI era. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011;16:1344-1363.

Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ and Meseguer M. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006b;85:371-383.

Muriel L, Meseguer M, Fernandez JL, Alvarez J, Remohi J, Pellicer A and Garrido N. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod* 2006a;21:738-744.

Nadalini M, Tarozzi N, Di Santo M and Borini A. Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better than the traditional one?. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:1045-1051.

Nadel JA and Borson DB. Modulation of tachykinins and bradykinin by enkephalinase. *Prog Clin Biol Res* 1988;263:123-130.

Nallella KP, Sharma RK, Aziz N and Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril* 2006;85:629-634.

Nanassy L, Liu L, Griffin J and Carrell DT. The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein Pept Lett* 2011;18:772-777.

Naruse M, Naruse K, Shizume K and Inagami T. Gonadotropin-dependent renin in the rat testes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984;177:337-342.

Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F and Tavalae M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:197-203.

Naz RK and Sellamuthu R. Receptors in spermatozoa: are they real?. *J Androl* 2006;27:627-636.

Nguyen G and Muller DN. The biology of the (pro)renin receptor. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:18-23.

Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T and Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002;109:1417-1427.

Nguyen G. Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin Sci (Lond)* 2011;120:169-178.

Odaka C, Mizuochi T, Shirasawa T, Morain P and Checler F. Murine T cells expressing high activity of prolyl endopeptidase are susceptible to activation-induced cell death. *FEBS Lett* 2002;512:163-167.

Ogawa T, Ohmura M and Ohbo K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int J Hematol* 2005;82:381-388.

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

Oliva R, Martinez-Heredia J and Estanyol JM. Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. *Syst Biol Reprod Med* 2008;54:23-36.

## Bibliografía

---

Oliver WJ and Gross F. Unique specificity of mouse angiotensinogen to homologous renin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;122:923-926.

O'Mahony OA, Djahanbakhch O, Mahmood T, Puddefoot JR and Vinson GP. Angiotensin II in human seminal fluid. *Hum Reprod* 2000;15:1345-1349.

OMS. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5, ilustrada edn, 2010.

Osada T, Watanabe G, Kondo S, Toyoda M, Sakaki Y and Takeuchi T. Male reproductive defects caused by puromycin-sensitive aminopeptidase deficiency in mice. *Mol Endocrinol* 2001;15:960-971.

Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P and Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002;360:772-777.

Ostermeier GC, Goodrich RJ, Diamond MP, Dix DJ and Krawetz SA. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil Steril* 2005;83:1687-1694.

Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP and Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004;429:154.

Quimet T, Facchinetti P, Rose C, Bonhomme MC, Gros C and Schwartz JC. Neprilysin II: A putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:565-570.

Paasch U, Grunewald S, Agarwal A and Glandera HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004;81 Suppl 1:802-809.

Pan PP, Zhan QT, Le F, Zheng YM and Jin F. Angiotensin-converting enzymes play a dominant role in fertility. *Int J Mol Sci* 2013;14:21071-21086.

Pandey KN and Inagami T. Regulation of renin angiotensins by gonadotropic hormones in cultured murine Leydig tumor cells. Release of angiotensin but not renin. *J Biol Chem* 1986;261:3934-3938.

Pandey KN, Ascoli M and Inagami T. Induction of renin activity by gonadotropic hormones in cultured Leydig tumor cells. *Endocrinology* 1985;117:2120-2126.

Pandey KN, Misono KS and Inagami T. Evidence for intracellular formation of angiotensins: coexistence of renin and angiotensin-converting enzyme in Leydig cells of rat testis. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:1337-1343.

Parmentier M, Inagami T, Pochet R and Desclin JC. Pituitary-dependent renin-like immunoreactivity in the rat testis. *Endocrinology* 1983;112:1318-1323.

Paul M, Poyan Mehr A and Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006;86:747-803.

Pauls K, Metzger R, Steger K, Klonisch T, Danilov S and Franke FE. Isoforms of angiotensin I-converting enzyme in the development and differentiation of human testis and epididymis. *Andrologia* 2003;35:32-43.

Payan-Carreira R, Borges P, Mir F and Fontbonne A. Molecular Markers in Sperm Analysis. In *InTech. Open Science* (ed) . 2013. Creative Commons, pp. 93-115.

Pijacka W, Hunter MG, Broughton Pipkin F and Luck MR. Expression of renin-angiotensin system components in the early bovine embryo. *Endocr Connect* 2012;1:22-30.

Pinto FM, Ravina CG, Subiran N, Cejudo-Roman A, Fernandez-Sanchez M, Irazusta J, Garrido N and Candenás L. Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:104-7827-8-104.

Piotrowska-Nitsche K and Chan AW. Effect of sperm entry on blastocyst development after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection - mouse model. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:81-89.

Piva TJ, Davern CM, Francis KG, Chojnowski GM, Hall PM and Ellem KA. Increased ecto-metalloproteinase activity in cells undergoing apoptosis. *J Cell Biochem* 2000;76:625-638.

Polansky FF and Lamb EJ. Do the results of semen analysis predict future fertility? A survival analysis study. *Fertil Steril* 1988;49:1059-1065.

Porrello ER, Delbridge LM and Thomas WG. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:958-972.

Pringle KG, Tadros MA, Callister RJ and Lumbers ER. The expression and localization of the human placental prorenin/renin-angiotensin system throughout pregnancy: roles in trophoblast invasion and angiogenesis?. *Placenta* 2011;32:956-962.

Quill TA, Ren D, Clapham DE and Garbers DL. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12527-12531.

Rago V, Giordano F, Brunelli E, Zito D, Aquila S and Carpino A. Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa. *J Anat* 2014;224:732-736.

Rahman MS, Kwon WS and Pang MG. Calcium influx and male fertility in the context of the sperm proteome: an update. *Biomed Res Int* 2014;2014:841615.

Rahman MS, Lee JS, Kwon WS and Pang MG. Sperm proteomics: road to male fertility and contraception. *Int J Endocrinol* 2013;2013:360986.

Ramirez M, Prieto I, Alba F, Vives F, Banegas I and de Gasparo M. Role of central and peripheral aminopeptidase activities in the control of blood pressure: a working hypothesis. *Heart Fail Rev* 2008;13:339-353.

## Bibliografía

---

Ramya T, Misro MM, Sinha D, Nandan D and Mithal S. Altered levels of seminal nitric oxide, nitric oxide synthase, and enzymatic antioxidants and their association with sperm function in infertile subjects. *Fertil Steril* 2011;95:135-140.

Ravina CG, Seda M, Pinto FM, Orea A, Fernandez-Sanchez M, Pintado CO and Candenias ML. A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. *Hum Reprod* 2007;22:1617-1625.

Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Shayesteh M and Tavalaei M. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. *Andrologia* 2010;42:13-19.

Re RN. Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. *Hypertension* 2003;42:117-122.

Reis AB, Araujo FC, Pereira VM, Dos Reis AM, Santos RA and Reis FM. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. *J Mol Histol* 2010;41:75-80.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E and Greco E. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online* 2005;10:669-681.

Robert M and Gagnon C. Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. *Biol Reprod* 1996;55:813-821.

Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H and Johannisson A. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod Suppl* 2001;58:129-145.

Romany L, Garrido N, Motato Y, Aparicio B, Remohi J and Meseguer M. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertil Steril* 2014;102:1567-75.e1.

Roques BP. New approach in the research of analgesics and antihypertensive agents. *Ann Pharm Fr* 1991;49:317-326.

Roqueta-Rivera M, Abbott TL, Sivaguru M, Hess RA and Nakamura MT. Deficiency in the omega-3 fatty acid pathway results in failure of acrosome biogenesis in mice. *Biol Reprod* 2011;85:721-732.

Roy A, Lin YN, Agno JE, DeMayo FJ and Matzuk MM. Absence of tektin 4 causes asthenozoospermia and subfertility in male mice. *FASEB J* 2007;21:1013-1025.

Ruvolo G, Fattouh RR, Bosco L, Bruculeri AM and Cittadini E. New molecular markers for the evaluation of gamete quality. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:207-212.

Sabeur K, Vo AT and Ball BA. Effects of angiotensin II on the acrosome reaction in equine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 2000;120:135-142.

Said TM and Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17:719-733.

Sakkas D, Manicardi G, Bianchi PG, Bizzaro D and Bianchi U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1995;52:1149-1155.

Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N and Barratt CL. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes?. *Hum Reprod Update* 2015;21:711-726.

Salvolini E, Buldreghini E, Lucarini G, Vignini A, Di Primio R and Balercia G. Nitric oxide synthase and tyrosine nitration in idiopathic asthenozoospermia: an immunohistochemical study. *Fertil Steril* 2012;97:554-560.

Samplaski MK, Agarwal A, Sharma R and Sabanegh E. New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. *Int J Urol* 2010;17:839-847.

Sanchez V, Wistuba J and Mallidis C. Semen analysis: update on clinical value, current needs and future perspectives. *Reproduction* 2013;146:R249-58.

Santiso R, Tamayo M, Gosalvez J, Meseguer M, Garrido N and Fernandez JL. Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertil Steril* 2010;93:314-318.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8258-8263.

Schunkert H, Ingelfinger JR, Hirsch AT, Pinto Y, Remme WJ, Jacob H and Dzau VJ. Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin II. *Circ Res* 1993;72:312-318.

Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 2002;77:873-882.

Sheriff DS and Ali EF. Perspective on plasma membrane cholesterol efflux and spermatozoal function. *J Hum Reprod Sci* 2010;3:68-75.

Shibahara H, Kamata M, Hu J, Nakagawa H, Obara H, Kondoh N, Shima H and Sato I. Activity of testis angiotensin converting enzyme (ACE) in ejaculated human spermatozoa. *Int J Androl* 2001;24:295-299.

Shimizu Y, Kodama H, Fukuda J and Tanaka T. Evidence of proacrosin molecule abnormality as a possible cause of low acrosin activity and unexplained failure of fertilization in vitro. *J Androl* 1997;18:281-288.

Shishido Y, Furushiro M, Tanabe S, Shibata S, Hashimoto S and Yokokura T. Effects of prolyl endopeptidase inhibitors and neuropeptides on delayed neuronal death in rats. *Eur J Pharmacol* 1999;372:135-142.

Siems WE, Heder G, Hilse H, Baeger I, Engel S and Jentzsch KD. Angiotensin-converting enzyme and other peptidolytic enzymes in human semen and relations to its spermatologic parameters. *Andrologia* 1991;23:185-189.

Simmons LW and Fitzpatrick JL. Sperm wars and the evolution of male fertility. *Reproduction* 2012;144:519-534.

Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, Emery B and Carrell DT. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 2014;29:904-917.

Singh US, Kumar MV and Panda JN. Angiotensin converting enzyme in semen and its possible role in capacitation. *Andrologia* 1985;17:472-475.

Skov J, Persson F, Frokiaer J and Christiansen JS. Tissue Renin-Angiotensin systems: a unifying hypothesis of metabolic disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:23.

Sloter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J and Wyrobek AJ. Quantitative effects of male age on sperm motion. *Hum Reprod* 2006;21:2868-2875.

Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S and Sekeris CE. Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod* 2005;20:3481-3487.

Specht IO, Spano M, Hougaard KS, Manicardi GC, Bizzaro D, Toft G, Giwercman A and Bonde JP. Relationship between apoptotic markers in semen from fertile men and demographic, hormonal and seminal characteristics. *Asian J Androl* 2012;14:890-896.

Speth RC, Daubert DL and Grove KL. Angiotensin II: a reproductive hormone too?. *Regul Pept* 1999;79:25-40.

Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 2008;52:455-462.

Subiran N, Agirregoitia E, Valdivia A, Ochoa C, Casis L and Irazusta J. Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil Steril* 2008;89:1571-1577.

Subiran N, Candenás L, Pinto FM, Cejudo-Roman A, Agirregoitia E and Irazusta J. Autocrine regulation of human sperm motility by the met-enkephalin opioid peptide. *Fertil Steril* 2012;98:617-625.e3.

Subiran N, Pinto FM, Agirregoitia E, Candenás L and Irazusta J. Control of APN/CD13 and NEP/CD10 on sperm motility. *Asian J Androl* 2010;12:899-902.

- Suganuma T, Ino K, Shibata K, Nomura S, Kajiyama H, Kikkawa F, Tsuruoka N and Mizutani S. Regulation of aminopeptidase A expression in cervical carcinoma: role of tumor-stromal interaction and vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2004;84:639-648.
- Sutovsky P and Schatten G. Paternal Contributions to the Mammalian Zygote: Fertilization after Sperm-Egg Fusion. *Int Rev Cytol* 1999;195:1-65.
- Sutovsky P, Hauser R and Sutovsky M. Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. *Hum Reprod* 2004;19:628-638.
- Sutovsky P, Terada Y and Schatten G. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum Reprod* 2001;16:250-258.
- Swyer GI. The release of hyaluronidase from spermatozoa. *Biochem J* 1947;41:413-417.
- Tebbs C, Pratten MK and Broughton Pipkin F. Angiotensin II is a growth factor in the peri-implantation rat embryo. *J Anat* 1999;195 ( Pt 1):75-86.
- Teixeira DM, Barbosa MA, Ferriani RA, Navarro PA, Raine-Fenning N, Nastri CO and Martins WP. Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;7:CD010167.
- Tesarik J, Greco E and Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004;19:611-615.
- Thekkumkara TJ, Livingston W,3rd, Kumar RS and Sen GC. Use of alternative polyadenylation sites for tissue-specific transcription of two angiotensin-converting enzyme mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1992;20:683-687.
- Togo T and Morisawa M. 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*. *Dev Biol* 1997;182:219-227.
- Togo T and Morisawa M. GPI-anchored aminopeptidase is involved in the acrosome reaction in sperm of the mussel *mytilusedulis*. *Mol Reprod Dev* 2004;67:465-471.
- Toledo AA, Mitchell-Leef D, Elsner CW, Slayden SM and Roudebush WE. Fertilization potential of human sperm is correlated with endogenous platelet-activating factor content. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:192-195.
- Toshimori K, Ito C, Maekawa M, Toyama Y, Suzuki-Toyota F and Saxena DK. Impairment of spermatogenesis leading to infertility. *Anat Sci Int* 2004;79:101-111.
- Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJ, Klein BM, Helmggaard L and Arce JC. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online* 2013;27:353-361.

## Bibliografía

---

van der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC and Lombard CJ. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecol Obstet Invest* 2005;59:86-91.

Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ and Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 2001;7:495-500.

Vanha-Perttula T, Mather JP, Bardin CW, Moss SB and Bellve AR. Localization of the antigotensin-converting enzyme activity in testis and epididymis. *Biol Reprod* 1985;33:870-877.

Varagic J and Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1435-1442.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.

Vermey BG, Chapman MG, Cooke S and Kilani S. The relationship between sperm head retardance using polarized light microscopy and clinical outcomes. *Reproductive BioMedicine Online* 2015;30:67-73.

Vinson GP and Ho MM. Origins of zonation: the adrenocortical model of tissue development and differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1998;25:S91-6.

Vinson GP, Ho MM and Puddefoot JR. The distribution of angiotensin II type 1 receptors, and the tissue renin-angiotensin systems. *Mol Med Today* 1995b;1:35-39.

Vinson GP, Mehta J, Evans S, Matthews S, Puddefoot JR, Saridogan E, Holt WV and Djahanbakhch O. Angiotensin II stimulates sperm motility. *Regul Pept* 1996;67:131-135.

Vinson GP, Puddefoot JR, Ho MM, Barker S, Mehta J, Saridogan E and Djahanbakhch O. Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J Endocrinol* 1995a;144:369-378.

Vinson GP, Saridogan E, Puddefoot JR and Djahanbakhch O. Tissue renin-angiotensin systems and reproduction. *Hum Reprod* 1997;12:651-662.

Visconti PE and Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998;59:1-6.

Waites GM. Male fertility regulation: the challenges for the year 2000. *Br Med Bull* 1993;49:210-221.

Walther T, Balschun D, Voigt JP, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C, Ganten D and Bader M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem* 1998;273:11867-11873.

Wenk MR. Lipidomics: New Tools and Applications. *Cell* 2010;143:888-895.

Wennemuth G, Babcock DF and Hille B. Distribution and function of angiotensin II receptors in mouse spermatozoa. *Andrologia* 1999;31:323-325.

Williams PJ, Mistry HD, Innes BA, Bulmer JN and Broughton Pipkin F. Expression of AT1R, AT2R and AT4R and their roles in extravillous trophoblast invasion in the human. *Placenta* 2010;31:448-455.

Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila AP, Primakoff P, Myles DG and White JM. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol* 1995;169:378-383.

Wu JT, Tsai PS, Lee SL and Cheng FP. Characterisation of the progesterone receptor on canine spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2005;17:733-741.

Xu P, Santos RA, Bader M and Alenina N. Alterations in gene expression in the testis of angiotensin-(1-7)-receptor Mas-deficient mice. *Regul Pept* 2007;138:51-55.

Xu W, Hu H, Wang Z, Chen X, Yang F, Zhu Z, Fang P, Dai J, Wang L, Shi H et al. Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. *J Proteomics* 2012;75:5426-5436.

Yamamoto H, Kaneko K, Ohba K, Morimoto R, Hirose T, Satoh F, Totsune K and Takahashi K. Increased expression of (pro)renin receptor in aldosterone-producing adenomas. *Peptides* 2013;49:68-73.

Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 1994;2:371-372.

Yanagimachi R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 1970;23:193-196.

Ye H, Huang GN, Gao Y and Liu de Y. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2006;21:1545-1550.

Yoshida M, Kawano N and Yoshida K. Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3446-3457.

Yoshikawa A, Aizaki Y, Kusano K, Kishi F, Susumu T, Iida S, Ishiura S, Nishimura S, Shichiri M and Senbonmatsu T. The (pro)renin receptor is cleaved by ADAM19 in the Golgi leading to its secretion into extracellular space. *Hypertens Res* 2011;34:599-605.

Yoshimura Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front Neuroendocrinol* 1997;18:247-291.

Zhu JL, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Basso O and Olsen J. Paternal age and congenital malformations. *Hum Reprod* 2005;20:3173-3177.

Zhuo JL, Ferrao FM, Zheng Y and Li XC. New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:166.

Zini A, Bielecki R, Phang D and Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674-677.

## **Bibliografía**

---

Zorn B, Vidmar G and Meden-Vrtovec H. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 2003;26:279-285.



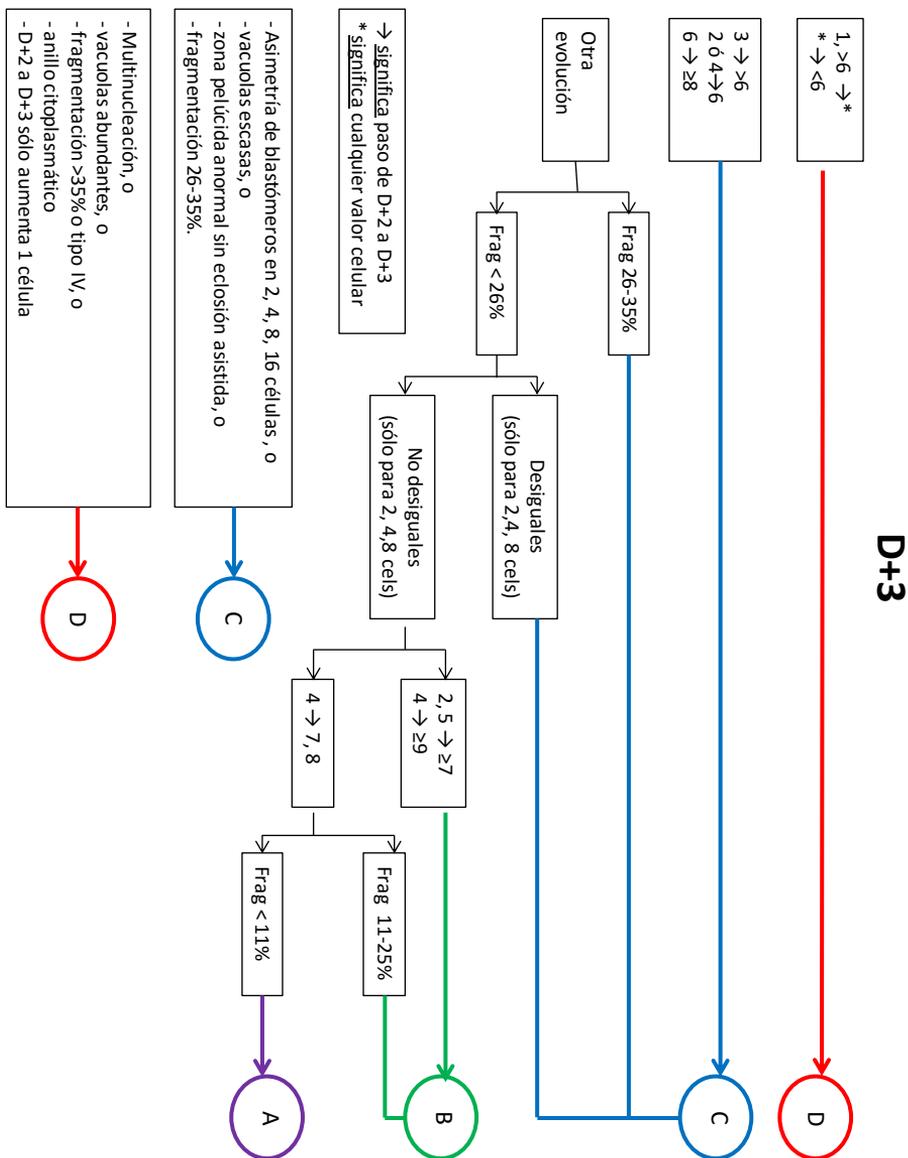


## **VIII. ANEXOS**





## 2. Gradación de la calidad embrionaria en D+3



**Figura 58.** Tabla que resume la asignación de las distintas gradaciones de calidad embrionaria de los embriones en D+3 de desarrollo según los criterios marcados por la 2ª revisión de los criterios de ASEBIR. Modificado de ASEBIR, 2008.

### 3. Gradación de la calidad embrionaria en D+5 y D+6

CALIDAD	Organización en blastocisto	Zona Pelúcida	MCI	Tamaño MCI	TE	Grado de expansión
Blastocisto A	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800 $\mu\text{m}^2$ - 1900 $\mu\text{m}^2$	Epitelio homogéneo Células elípticas	El blastocele ocupa todo el volumen del embrión
Blastocisto B	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800 $\mu\text{m}^2$ - 1900 $\mu\text{m}^2$	Epitelio irregular	
Blastocisto C	En D+6			< 1900 $\mu\text{m}^2$	Epitelio homogéneo Células elípticas	
Blastocisto D	En D+6			< 1900 $\mu\text{m}^2$	Epitelio irregular Células escasas	

**Figura 59.** Tabla que resume la asignación de las distintas gradaciones de calidad embrionaria de los embriones en D+5 y D+6 de desarrollo según los criterios marcados por la 2ª revisión de los criterios de ASEBIR. Modificado de ASEBIR, 2008.



## **ANEXO II: Listado de reactivos y materiales de laboratorio, y los equipos y programas informáticos**

### **1.1. Reactivos y materiales de laboratorio**

#### **1.1.1. Reactivos**

- Ácido binciconínico (BCA): Bicinchoninic acid solution, B9643, Sima-Aldrich
- Acrilamida: 30% Acrylamide/Bis Solution, 161-0156, Bio-Rad
- Albúmina sérica bovina (BSA): Bovine serum albumin, A-7906, Sigma-Aldrich
- Azida. Sodium azide, S-8032, Sigma-Aldrich
- Cóctel de inhibidores de fosfatasa: Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (P5726) y Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (P0044), Sigma
- Cóctel de inhibidores de proteasas: Protease Inhibitor Cocktail, P8340, Sigma
- DNasa: RNase-free DNase Set, 79254, Quiagen
- Etanol. Ethanol 96%, 141085, Panreac
- Fluoromont G, 0100-01, Southern Biotech
- Hoechst 33258. Hoechst 33258, pentahydrate (bis- benzidime) H1398, Invitrogen
- Isopropanol, P-1009, Sigma.
- Marcadores de peso molecular: Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, 161-0374, Bio-Rad
- Metanol: Methanol reagent grade, ACS, ISO, Reag. Ph Eur, packed in HDPE bottles, ME0303, Scharlau
- Paraformaldehído. Paraformaldehyde 95%, 158127, Sigma
- Peróxido de hidrogeno. Hydrogen peroxide solution. H1009, Sigma
- Persulfato amónico: ammonium persulfate, A-3678, Sigma
- Poli-Lisina. Poly-L-Lysine hydrobromide, P1524, Sigma
- RNasa: RNase A, 19101, Quiagen.
- Suero bovino fetal (SBF). Fetal bovine serum, 50115, Biochrom
- Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), 2791, Merck
- Tampón RIPA, 0278, Sigma
- TEMED: N,N,NN´N´- tetrametiletildiamina, T9281, Sigma-Aldrich
- Tritón® X-100, T8787, Sigma-Aldrich

### 1.1.2. Disoluciones

#### 1.1.2.1. Soluciones tampón

- **Tris-HCl 0,2 M:**

4,85 g Trizma base y 100mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 7,4 usando HCl 1N.

- **Tris-HCl 1 M:**

12,11 g Trizma base y 100mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 8,8 usando HCl 1N.

- **Tris-HCl 0,5 M:**

6,05 g Trizma base y 100mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 6,8 usando HCl 1N.

- **PBS:**

NaCl 137mM, KCl 2,7mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1mM y agua destilada.

#### 1.1.2.2. Soluciones para western Blot

- **SDS 10%**

10 g SDS y 100 mL de agua destilada.

- **Persulfato amónico 10%**

1 g persulfato amónico y 10 mL de agua destilada.

- **Gel separador**

Acilamida (10%), Tris-HCl pH 8,8 1M (25% vol/vol), SDS (1% vol/vol), persulfato amónico 10% (50  $\mu\text{L}$ ), TEMED (10  $\mu\text{L}$ ) y agua destilada.

- **Gel concentrador**

Acilamida/Bis (4%), Tris-HCl pH 6,8 0,5M (25% vol/vol), SDS (1% vol/vol), persulfato amónico 10% (50  $\mu\text{L}$ ), TEMED (10  $\mu\text{L}$ ) y agua destilada.

- **Tampón de carga (en condiciones desnaturalizantes):**

Tris-HCl pH 6,8 50mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1% y agua destilada.

- **Tampón de electroforesis:**

Tris-HCl pH 8,8 250mM, SDS 1%, glicina 1,92M y agua destilada. Para utilizar, diluir 10 veces en agua destilada.

- **Tampón de transferencia:**

Tris-HCl pH 8,3 50mM, SDS 0,25%, glicina 0,96M y agua destilada. Para utilizar, diluir 5 veces en agua destilada. Justo antes de utilizarse, se le añade metanol 20%.

- **Blotto:**

Tris-HCl pH 7,4 0,2M, NaCl 0,15M, Tritón X-100 1% y agua destilada.

- **Solución de bloqueo:**

Blotto-leche desnatada en polvo al 5%.

- **Anticuerpos primarios**

Blotto, azida 0,02%, anticuerpo primario en dilución adecuada.

- **Anticuerpo secundario (IgG) conjugado a peroxidasa**

Blotto, leche desnatada en polvo al 5%, azida 0,02%, anticuerpo secundario en dilución adecuada.

- **Reactivo quimioluminiscente (sistema ECL)**

Luminol 1,25 (DMSO), ácido p-cumárico 0,2mM (DMSO), Tris HCl pH 8,50 2M y agua destilada. En el momento de utilizarse, se le añade  $H_2O_2$  0,03% (vol/vol)

## **1.2. Equipamiento y programas informáticos**

### **1.2.1. Equipamiento**

- ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Life technology
- Agitador magnético termostatzado Agimatic-s, Selecta
- Balancín ProBlot™ Rocker 25, Labnet
- Balanza de precisión R180D, Sartorius
- Cámara de recuento Makler®, Sefi Laboratories
- Centrifuga Heraeus Fresco 21, Thermo Electron Corporation
- Citómetro de flujo Gallios, Becton Dickinson
- Cubeta y soporte de electroforesis y transferencia. Mini trans-Blott III, Bio-Rad
- Embolo de teflón, Selecta
- Espectrofotómetro UV-2401 PC, Shimadzu
- Homogeneizador PZR 50, Heidolph Giralt
- Microscopio confocal de láser, Olympus Fluoview FV 500
- NanoDrop® ND-100, Thermo Scientific
- pH-metro GLP 21, Grison
- Pipetas automáticas de precisión de distintos volúmenes, BioPette Labnet y Eppendorf Research
- Sonicador Labsonic® P y sonda de titanio, B. Braun Biotech International
- Termociclador MyCycler™, Bio-Rad
- Trans-iluminador Chemidoc™ XRS, Bio-Rad
- Ultracongelador, MDF-U5 186S, Sanyo
- Ultraturrax, ART

### **1.2.2. Softwares y programas informáticos**

- ABI Prism7000 software, Life technology
- Programa informático de tratamiento de imágenes Image J
- Software informático Fluoview v 5.0.
- Software informático Quantity One, Bio-Rad
- Software Summit v4.3.

## **ANEXO III: Comunicaciones Indexadas.**

### **1. Artículos aceptados**

**Gianzo M**, Muñoa-Hoyos I, Urizar-Arenaza I, Larreategui Z, Quintana F, Garrido N, Subirán N, Irazusta J. (2015). **Angiotensin II type 2 receptor is expressed in human sperm cells and is involved in sperm motility.** *Fertility and Sterility*. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.11.004.

### **2. Participaciones en congresos**

- Estudio de la expresión del receptor de angiotensina II tipo 2 en espermatozoides humanos y su implicación en la movilidad espermática. **Marta Gianzo**, Muñoa I, Urizar-Arenaza I, Estonba H, Larreategui Z, Irazusta J, Subiran N. (2015). VIII Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). San Sebastian (España). Comunicación oral.
- Estudio del Receptor de Angiotensina II tipo 2 como posible diana terapéutica para la mejora de las técnicas de reproducción asistida. **Marta Gianzo**, Larreategui Z, Irazusta J, Subiran N. (2015). Zabalduz Eguna. Bizkaia (España). Póster.
- Angiotensin II AT2 receptor is expressed in human sperm cells and is involved in sperm motility. **Marta Gianzo**, Larreategui Z, Urizar-Arenaza I, Muñoa I, Estonba H, Irazusta J, Subiran N. (2015). 31<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Lisboa (Portugal). Póster.

### 3. Otras contribuciones durante el desarrollo de esta tesis

#### 3.1. Contribuciones en artículos

Estomba H & Muñoa-Hoyos I, **Gianzo M**, Urizar-Arenaza, Casis L, Irazusta J, Subiran N. (2016). **Opioid receptors are present in male germ cells and regulate meiosis**. Plos One.

#### 3.2. Contribuciones a congresos

- Estudio de los Receptores Opioides como posible diana terapéutica para la mejora de las técnicas de reproducción asistida. **Marta Gianzo**, Larreategui Z, Irazusta J, Subiran N. (2014). Zabalduz Eguna. Bizkaia (España). Comunicación oral y póster.
- La animopeptidasa sensible a puromicina (PSA) como posible marcador de la calidad folicular. Romeu-Perez C, Lierta M, Urries A, Muñoa I, **Gianzo M**, Casis L. (2015). VIII Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). San Sebastian (España). Póster.
- Can the intratesticular injection of antibodies be and alternative to the production of Knockout mice?. Maider Bizkarguenaga, **Marta Gianzo**, Laura Gómez Santos, Juan F. Madrid, Francisco J. Sáez y Edurne Alonso. (2015). XVIII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, VI International Congress of Histology and Tissue Engineering y II Congreso Iberoamericano de Histología. Bizkaia (España). Póster.
- The kappa-opioid receptor modulates the human sperm capacitation and acrosome reaction. Itziar Urizar-Arenaza, Iraia Muñoa, Haizea Estomba, **Marta Gianzo**, Roberto Matorras, Exposito A, Jon Irazusta, Nerea Subirán. (2015). 31<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Lisboa (Portugal). Póster.
- Opioid receptors are present in male germ cells and regulate meiosis. Estomba H, Muñoa I, **Gianzo M**, Urizar-Arenaza I, Casis L, Irazusta J, Subirán N. (2015). 31<sup>th</sup>

Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Lisboa (Portugal). Comunicación oral.

- Globozoospermia inducida mediante microinyección intratesticular del anticuerpo anti-GOPC. Maider Bizkarguenaga, **Marta Gianzo**, Laura Gómez Santos, Juan F. Madrid, Francisco J. Sáez y Edurne Alonso. (2014). XXXVII Congreso Nacional de Histología y 1er Congreso Iberoamericano de Histología. Cuernavaca (México). Póster

- Beta-endorfinaren eragina giza espermatozoideen erreakzio akrosomikoan. Itziar Urizar-Arenaza, Iraia Muñoa, Haizea Estomba, **Marta Gianzo**, Jon Irazusta eta Nerea Subirán. (2014). Ikergazte, Nazioarteko Ikerketa Euskeraz. Durango (España). Comunicación oral.

- Opioide hartzaileen deskribapena eta kokapena saguen hozi-zelula maskulinoetan. Haizea Estomba, Iraia Muñoa, Itziar Urizar-Arenaza, **Marta Gianzo**, Jon Irazusta eta Nerea Subirán. (2014). Ikergazte, Nazioarteko Ikerketa Euskeraz. Durango (España). Comunicación oral.

- Localización y expresión de los receptores opioides mu, delta y kappa, en células germinales masculinas. Estomba H, Muñoa I, Urizar-Arenaza I, **Gianzo M**, Valdivia A, Casis L, Irazusta J, Subirán N. (2014). XXX Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF). Barcelona (España). Comunicación oral.

- La beta-endorfina potencia la reacción acrosómica inducida por progesterona por una vía calcio independiente. Itziar Urizar Arenaza, Haizea Estomba, Iraia Muñoa, **Marta Gianzo**, Asier Valdivia, Luz Candenias, Roberto Matorras, Luis Casis, Jon Irazusta y Nerea Subirán. (2014). XXX Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF). Barcelona (España). Poster.

- Sistema Opioidearen bidezko Gizonezkoen Ugalketaren erregulazioa. Muñoa I, Estomba H, **Urizar-** Arenaza I, **Gianzo M**, Irazusta J, Casis L, Valdivia A, Subirán N. (2014). Osasun Zientzietako Ikertzaileen II. Topaketak. Eibar (España). Comunicación oral.