



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA
UNIDAD ZACATENCO**

**“Evaluación de marcadores de calidad y función espermáticas y su
utilidad como predictores del potencial fértil en la fertilización *in vitro*”**

Tesis que presenta

M. en C. Mayra Pamela Tello Mora

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias
en la Especialidad de Toxicología

Directoras de Tesis:

Dra. María Betzabet Quintanilla Vega

Dra. Esther López-Bayghen Patiño

Ciudad de México

Noviembre, 2018

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN en el laboratorio 5, en colaboración con el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular de Infertilidad y Genética, Ingenes México SC, y fue desarrollado, bajo la dirección de la Dra. María Betzabet Quintanilla Vega y la Dra. Esther López-Bayghen Patiño.

Durante el desarrollo de este trabajo se tuvo el apoyo de una beca de posgrado del Conacyt (No. 421573) y se contó con el apoyo económico del proyecto PEI-Conacyt 231793 otorgado a la Dra. López Bayghen Patiño.

RESUMEN

La fertilidad humana se ha visto disminuida en las últimas décadas y el factor masculino contribuye hasta con un 50%; factores externos como algunos hábitos nocivos, la dieta y la exposición a contaminantes ambientales se consideran factores de riesgo. Las técnicas de reproducción asistida permitan la fecundación facilitando la fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido parámetros de calidad espermática que no necesariamente reflejan la función de los espermatozoides, ya que individuos con calidad de semen buena no logran fertilizar ni tener un hijo vivo. Recientemente, la integridad de la cromatina espermática se ha relacionado con el potencial fértil, desarrollo embrionario y número de abortos espontáneos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de parámetros de función y calidad espermáticas como predictores del potencial fértil en la fertilización *in vitro* (FIV). Participaron 69 pacientes bajo tratamiento de FIV con donación de óvulos, las muestras de semen se analizaron de acuerdo a la OMS y se incluyó la evaluación de la integridad de la cromatina espermática mediante la técnica de SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) con los parámetros: índice de fragmentación del ADN (*DNA Fragmentation Index*- %DFI) y alta fluorescencia (*High Density Staining*- %HDS), así como la función espermática mediante la determinación de la reacción acrosomal (RA) espontánea (RAe) e inducida (RAi) a través de la detección de la proteína CD46 ± la inducción con un ionóforo de Ca^{2+} . También se cuantificaron las especies reactivas de oxígeno (EROS) a través de la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Posterior al procedimiento de FIV se colectaron los datos del número de óvulos donados por paciente (12.34 ± 4.85), la tasa de fertilización ($60.32 \pm 20.16\%$) y la tasa de blastocistos viables ($48.85 \pm 31.30\%$). Adicionalmente se exploró por cuestionario la exposición a factores de riesgo ambientales de tipo oxidante como la exposición al humo de tabaco, metales, hidrocarburos y plaguicidas, todos asociados con problemas de fertilidad masculina. La edad de los participantes fue de 40.05 ± 6.08 años y de acuerdo con los parámetros de semen, 67% de los participantes se diagnosticó como normospermicos. Considerando la función espermática, la media de la RAe fue de $3.2 \pm 1.8\%$ y de $13.4 \pm 4.2\%$ para la RAi; a partir de estos valores se calculó el índice de respuesta del acrosoma al reto con ionóforo (ARIC = RAi - RAe) que fue de 10.3 ± 5 . En relación con la integridad de la cromatina, se obtuvo una media del %DFI de 21.8 ± 6.3 y de 7.1 ± 3.5 para el %HDS. Por otro lado, la media de la intensidad de fluorescencia de las Especies Reactivas de oxígeno (EROS) fue de 1389.08 ± 981.80 . Se obtuvieron los modelos de regresión simple para determinar la asociación entre los resultados de FIV y los parámetros de calidad y función espermáticas. Los valores de EROS, así como los factores de riesgo ambientales evaluados por cuestionario no se asociaron con los resultados de FIV. Para la tasa de fertilización, el modelo final incluyó al ARIC ($\beta = 2.25$, $p < 0.0001$) que fue ajustado por la morfología espermática; de este modelo,

dicotomizando la tasa de fertilización en $\geq 60\%$ se generó el modelo logit y se obtuvo la ecuación de predicción con un punto de corte en la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) de 0.65 para clasificar como negativa o positiva la probabilidad obtenida de la ecuación, y con una sensibilidad de 63.2% y especificidad de 80.6%. En relación con la tasa de blastocistos viables, únicamente se obtuvo una asociación con el %DFI ($\beta = -1.77$, $p = 0.003$) y se generó el modelo logit y la ecuación de predicción dicotomizando la tasa de blastocistos viables en $\geq 40\%$; el punto de corte en la curva ROC se determinó en 0.75, con una sensibilidad de 62.8% y especificidad de 77.2%. Los resultados predictivos fueron validados para cada participante comparándolos con los valores reales de FIV, obteniendo una concordancia de 73.9 y 72.5%, respectivamente. Finalmente, los modelos de predicción se calcularon considerando sólo a los pacientes normospérmicos, en quienes se obtuvieron resultados similares. En conclusión, la fragmentación del ADN y la función acrosomal demostraron ser buenos predictores para obtener blastocistos viables y tener éxito en la fertilización, respectivamente, incluso en hombres con infertilidad inexplicable y calidad de semen buena. Por lo tanto, se propone que deben incluirse como parámetros de diagnóstico individual del potencial fértil en laboratorios de andrología, ya sea para proceder a una técnica de FIV o para identificar un riesgo potencial de problemas de fertilidad durante el análisis de semen o en estudios de investigación.

ABSTRACT

Human fertility has declined in recent decades and the male factor contributes up to 50%; external factors such as harmful habits, diet and exposure to environmental pollutants are considered risk factors. Assisted reproduction techniques facilitates *in vitro* fertilization and embryo development. World Health Organization (WHO) has established sperm quality parameters that do not necessarily reflect the sperm function, as individuals with good semen quality are unable to fertilize or have a live child. Recently, the integrity of sperm chromatin has been linked to male fertile potential, embryonic development and number of spontaneous abortions. The objective of this work was to evaluate the usefulness of sperm function and quality parameters as predictors of fertile potential in men undergoing *in vitro* fertilization (IVF). Sixty-nine patients undergoing IVF treatment with oocyte donation participated. The semen samples were analyzed according to WHO parameters, the evaluation of the sperm chromatin integrity by using SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) with the parameters: DNA Fragmentation Index (%DFI) and High Density Stainability (%HDS), and the sperm function by determining the spontaneous (sAR) and induced (iAR) acrosomal reaction through the detection of the CD46 protein \pm induction with a Ca^{2+} ionophore. Reactive oxygen species (ROS) were also quantified using the probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Following the IVF procedure, data of the number of oocytes donated per patient (12.34 ± 4.85), fertilization rate ($60.32 \pm 20.16\%$), and viable blastocyst rate ($48.85 \pm 31.30\%$) were collected. In addition, the exposure to environmental oxidant type risk factors, such as exposure to tobacco smoke, metals, hydrocarbons and pesticides, all associated with male fertility problems, was explored by questionnaire. The age of participants was 40.05 ± 6.08 years. According to the semen parameters, 67% of participants were diagnosed as normospermic. Considering the sperm function, the means of the sAR and iAR were $3.2 \pm 1.8\%$ and $13.4 \pm 4.2\%$, respectively. These values were used to calculate the response index of the acrosome to the challenge with an ionophore (ARIC = iAR - sAR), which was 10.3 ± 5 . In relation to the chromatin integrity, the mean of %DFI was 21.8 ± 6.3 and 7.1 ± 3.5 for %HDS. On the other hand, the mean fluorescence intensity of ROS was 1389.08 ± 981.80 . Simple regression models were used to associate IVF results with sperm quality or function parameters. ROS values as well as environmental risk factors evaluated by questionnaire were not associated with IVF results. For the fertilization rate, the final model included the ARIC ($\beta = 2.25$, $p < 0.0001$), which was adjusted by sperm morphology; from this model, the logit model was generated dichotomizing the fertilization rate at $\geq 60\%$, and the prediction equation was obtained with a cut-off point on the ROC curve of 0.65 to classify as negative or positive the probability obtained from the equation, and with a sensitivity of 63.2% and a specificity of 80.6%. In relation to the rate of viable blastocysts, only the association with %DFI ($\beta = -1.77$, $p = 0.003$) was obtained and the logit model and the prediction equation were generated by dichotomizing the rate of viable blastocysts at $\geq 40\%$; the cut-off point on the ROC curve was determined at 0.75, with a sensitivity of 62.8% and a specificity of 77.2%. The predictive results were validated for each participant by comparing them with the real values of IVF results, obtaining a concordance of 73.9 and 72.5%, respectively. Finally, the prediction models were calculated considering only normospermic patients, in whom similar results were obtained. In conclusion, DNA

fragmentation and acrosomal function were good predictors for viable blastocysts and fertilization success, respectively, even in men with unexplained infertility and good semen quality. Therefore, they should be included as individual parameters of the fertile potential diagnosis in andrology laboratories, either to proceed with an IVF technique or to identify a potential risk of fertility problems during semen analysis or research studies.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Betzabet Quintanilla Vega, muchas gracias por ser un pilar de mi formación académica, por toda su paciencia en tantos años, por alentarme a seguir adelante y confiar aun cuando los pocos ánimos sobresalían en mí.

A la Dra. Esther López-Bayghen, gracias por todo su apoyo y disposición para ayudar en este proyecto, por su buen ánimo siempre y enseñarme a buscar soluciones prácticas.

A las Dra. Leticia Hernández Cadena, gracias por su invaluable asesoramiento en la estadística, así como la oportunidad de ampliar mi experiencia como docente.

A la Dra. Isabel Hernández Ochoa por su aportación con nuevas ideas y asesoramiento en cada avance.

Al Dr. Ricardo Félix por sus valiosas aportaciones y objetividad, siempre fue muy agradable ver su entusiasmo en el proyecto.

Al Dr. Manuel Sánchez gracias por su disponibilidad para aportar y aterrizar nuestras ideas.

A la M en C. María de Jesús Solís Heredia por su apoyo técnico durante la primera parte del desarrollo del proyecto.

Al técnico Gerardo Martínez Aguilar por su apoyo en el laboratorio.

Al Colegio de Profesores del Departamento de Toxicología del Cinvestav por ser parte de mi formación estos años, cada uno siempre tuvo una palabra de aliento o de felicitación que aprecio mucho.

A mis compañeros de laboratorio, los que llegaron, los que se fueron en todos estos años, cada uno sin duda aportó algo en mí, sobre todo a aquellos con los que se forjaron lazos de hermandad y confianza.

Al CONACYT por la beca proporcionada para la realización de mis estudios de posgrado.

Gracias a todo el personal de Ingenes, especialmente al área de Andrología por la toma de muestra y los análisis, a enfermería por su apoyo en los cuestionarios, a las chicas de LIDMOL en ese momento, Eli y Azu por ser tan buena compañía.

A mi familia y amigos que estuvieron al pendiente de mi avance, siempre haciéndome saber lo orgullosos que estaban de mí, aunque jamás entendían lo que hacía.

Mary, Yaz, Lety literalmente no sé qué hubiera hecho sin ustedes, no hubo momento, bueno o malo en que ustedes no estuvieran apoyándome, voy a extrañar todos esos momentos juntas, las quiero y las admiró mucho.

Margarita, no hay nada que no te haya dicho mil veces en persona, gracias por ser la mamá más mala del mundo, mi amiga y mi apoyo incondicional, eres mi gran ejemplo de que solo se necesita querer para salir adelante, espero que siempre pueda hacerte sentir orgullosa como yo lo estoy de ti.

Mario, mi amor verdadero, uno de los dos tenía que tener el “Dr.”, ya cumplí... tu y yo tenemos una historia muy larga, con malos momentos, pero sin duda muchos más perfectos, agradezco al universo que te pusiera en mi camino por que me enseñaste que no todo es blanco y negro, y que no podía vivir en una burbuja, eso me ha impulsado a tomar decisiones que me han hecho sentir más feliz y nada vale más que eso.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	III
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 ESPERMATOGÉNESIS.....	15
1.1.1 Espermatozoides.....	16
1.1.2 Calidad espermática.....	17
1.1.3 Integridad del ADN de los espermatozoides	18
1.2 FERTILIZACIÓN	20
1.2.1 Capacitación de los espermatozoides.....	22
1.2.2 Reacción acrosomal (RA).....	23
1.3 INFERTILIDAD MASCULINA.....	24
1.3.1 Técnicas de reproducción asistida (ART).....	25
1.4 DAÑO OXIDANTE Y LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA.....	26
1.4.1 La exposición ambiental a compuestos pro-oxidantes y su efecto sobre la fertilidad masculina	28
1.5 JUSTIFICACIÓN	29
1.6 HIPÓTESIS.....	30
1.7 OBJETIVOS.....	30
1.7.1 Objetivo general	30
1.7.2 Objetivos particulares	30
2. MÉTODOS	31
2.1 Diseño del estudio.....	31
2.1.1 Criterios de inclusión	31
2.1.2 Variables independientes y dependientes del estudio.....	32
2.1.3 Variables confusoras y covariables en el éxito de la fertilización y desarrollo de blastocistos viables.	32
2.2 Recolección de las muestras	32
2.3 Determinación de la calidad espermática.....	32
2.4 Capacitación espermática.....	33

2.4.1	Principio.....	33
2.4.2	Procedimiento.....	34
2.5	Fertilización <i>in vitro</i>	34
2.5.1	Principio.....	34
2.5.2	Estimulación ovárica para la donación de ovocitos	34
2.5.3	Cultivo de embriones.....	35
2.6	Evaluación de la reacción acrosomal.....	36
2.6.1	Principio.....	36
2.6.2	Procedimiento.....	36
2.7	Evaluación del daño al ADN	37
2.7.1	Principio.....	37
2.7.2	Procedimiento.....	37
2.8	Evaluación de los niveles de EROS en los espermatozoides	38
2.8.1	Principio.....	38
2.8.2	Procedimiento.....	38
2.9	Análisis estadístico.....	38
3.	RESULTADOS	40
3.1	Características generales de la población de estudio	40
3.2	Calidad de semen de acuerdo con los parámetros de la OMS y su asociación con la fertilidad	40
3.3	Evaluación de la RA y su asociación con la fertilidad	42
3.4	Integridad de la cromatina espermática y su asociación con la fertilidad.....	45
3.5	Niveles de EROS en los espermatozoides	47
3.6	Factores ambientales asociados con la alteración en la fertilidad	48
3.6.1	Asociación entre los factores ambientales de riesgo con la fertilización y los blastocistos viables	49
3.6.2	Asociación entre los factores ambientales de riesgo con los parámetros de función y calidad espermática	50
3.7	Modelo de predicción de la tasa de fertilización <i>in vitro</i>	51
3.8	Modelo de predicción para la tasa de blastocistos viables.....	53
3.9	Modelo de predicción en pacientes normospérmicos	55
4.0	DISCUSIÓN.....	57
4.1	Características generales de la población de estudio	57

4.2	Calidad de semen de acuerdo con los parámetros de la OMS y su asociación con la fertilidad	58
4.3	Reacción acrosomal y su asociación con la fertilidad	59
4.4	Integridad de la cromatina espermática y su asociación con la fertilidad	60
4.5	Niveles de EROS en los espermatozoides	61
4.6	Factores ambientales asociados con la alteración en la fertilidad	63
4.7	Modelo de predicción para la tasa de fertilización <i>in vitro</i>	64
4.8	Modelo de predicción para la tasa de blastocistos viables.....	65
4.9	Modelo de predicción en pacientes normospérmicos	66
4.10	Limitaciones del estudio	67
5.	CONCLUSIONES.....	68
6.	PERSPECTIVAS.....	69
7.	REFERENCIAS.....	70
	Anexo 1: Carta de consentimiento del estudio del comité de ética de Ingenes.....	77
	Anexo 2: Productos generados de este trabajo.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Regiones del espermatozoide.....	17
Figura 2. Proceso de fertilización en los mamíferos.....	21
Figura 3. Fuentes de EROS que contribuyen al desarrollo de problemas de fertilidad.....	27
Figura 4. Diagrama de la estrategia experimental.....	33
Figura 5. Análisis por citometría de flujo de la RAe y RAi en células espermáticas.	43
Figura 6. Asociación entre la RA y la tasa de fertilización por FIV	44
Figura 7. Asociación negativa entre la RAe y el % de blastocistos viables	45
Figura 8. Asociación entre la integridad de la cromatina espermática y el desarrollo de blastocistos viables.	46
Figura 9. Niveles de estrés oxidante en los espermatozoides de los participantes.	47
Figura 10. Asociación entre las EROS y la motilidad espermática.....	48
Figura 11. Asociación positiva entre las EROS y la integridad de la cromatina espermática	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Resultados del procedimiento FIV de los participantes.	41
Tabla 2. Resultados de la calidad de semen de los participantes.	41
Tabla 3. Asociación bivariada entre los parámetros de la OMS y FIV.....	42
Tabla 4. Modelo multivariado del éxito en la fertilización <i>in vitro</i>	51
Tabla 5. Modelo logit para el éxito en la tasa de fertilización $\geq 60\%$	52
Tabla 6. Modelo de regresión lineal simple para el desarrollo de blastocistos viables.....	53
Tabla 7. Modelo de logit para el desarrollo de blastocistos viables $\geq 40\%$	54
Tabla 8. Modelo logit para el éxito en la tasa de fertilización en hombres normospermicos.	55
Tabla 9. Modelo logit para el éxito en la tasa de blastocistos viables en hombres normospermicos.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxi-2-desoxiguanosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARIC	Índice de respuesta del acrosoma al reto con ionóforo
ART	Técnicas de reproducción asistida
DFI	Índice de fragmentación de ADN
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FIV	Fertilización
HDS	Alta tinción del ADN
ICSI	Inyección intracitoplásmica
IMC	Índice de masa corporal
OMS	Organización Mundial de la Salud
RA	Reacción acrosomal
RAe	Reacción acrosomal espontánea
RAi	Reacción acrosomal inducida
SCSA	Ensayo de la estructura de la cromatina espermática
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México
ZP	Zona pelúcida

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESPERMATOGÉNESIS

Los testículos consisten en túbulos seminíferos (90% de la masa en los adultos) y el intersticio (10% de la masa). En los túbulos seminíferos se lleva a cabo la espermatogénesis o proceso de producción de espermatozoides; están compuestos por tres tipos celulares principales: células mioideas peritubulares, células de Sertoli y células germinales. Las células de Sertoli envían señales externas y proveen factores para la proliferación y diferenciación de las células germinales, y en el espacio intersticial se localizan a las células de Leyding encargadas de la secreción hormonal y los vasos capilares y linfáticos (Svingen y Koopman, 2013). En la primera fase de la espermatogénesis, las espermatogonias tipo A y B se encuentran en la lámina basal del epitelio y proliferan por mitosis. Las espermatogonias tipo B dan origen a los espermatocitos primarios en el compartimento basal del túbulo seminífero y se diferencian a espermatocitos en preleptoteno y leptoteno. Estas células atraviesan la barrera hemato-testicular (BHT) y entran al compartimento adluminal. La segunda fase es la meiótica, y al completarse la primera meiosis resultan dos espermatocitos secundarios, y por cada espermatocito secundario que entra a la segunda meiosis se obtienen dos espermátides (células haploides) que finalmente pasan por la fase de espermiogénesis en el compartimento adluminal del túbulo seminífero para diferenciarse a espermatozoides y salir al lumen (Cheng, 2008).

Los espermatozoides que salen al lumen de los túbulos por el proceso de espermiogénesis y entran al epidídimo no son funcionales y carecen de motilidad y la habilidad para fecundar al ovocito. El epidídimo está dividido en 3 regiones: la cabeza, el cuerpo y la cola. Cada región tiene distintas funciones: en la cabeza y el cuerpo se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides, mientras que la cola sirve para el almacenamiento de los espermatozoides maduros (Wistuba et al., 2007). La maduración espermática involucra cambios bioquímicos y morfológicos en la superficie de los espermatozoides en respuesta a las enzimas, proteínas y glicoproteínas secretadas por el epidídimo que son esenciales para la adquisición de la capacidad

fertilizante. Dentro de las proteínas espermáticas que son modificadas durante el tránsito epididimal se encuentran ADAM2, ADAM3, ADAM24 (*A desintegrin and metalloproteinases 2, 3 y 24*), Spam 1 (*Sperm adhesion molecule 1*), lactato deshidrogenasa y β galactosidasa (Arrotéa et al., 2011). Así mismo, existen proteínas apocrinas que son transferidas del epitelio epididimal al espermatozoide a través de la secreción de exosomas (también llamados epididisomas), en donde estas proteínas son intercambiadas en la superficie espermática por lipoproteínas presentes en el fluido epididimal, dentro de estas proteínas se encuentra la clusterina, CRISP1 (*Cysteine-rich secretory protein 1*), P26h (*Hamster sperm protein*), HE5 (*Human epididymal protein 5*), ubiquitina y glutatión peroxidasa (Sullivan et al., 2005). En humanos, el espermatozoide toma aproximadamente 10 días para viajar del segmento inicial a la cola del epidídimo, y una vez ahí son completamente maduros y pueden ser almacenados por días o semanas dependiendo de la especie hasta que la eyaculación ocurre. Se ha reportado que cerca del 40% de los hombres infértiles muestran desórdenes durante la maduración epididimal, y logran la fecundación únicamente a través de técnicas de reproducción asistida (ART, por sus siglas en inglés) (Cornwall, 2009).

1.1.1 Espermatozoides

En promedio, un hombre produce 4.4 millones de espermatozoides por gramo de testículo por día y el número de espermatozoides por eyaculación está influenciado por la edad, tamaño testicular, frecuencia de eyaculación y época del año. Los espermatozoides en todas las especies animales están conformados de una manera similar (**Figura 1**). La cabeza (2-5 μm de diámetro) está subdividida en cuatro regiones: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial, contiene al núcleo con el ADN altamente compactado y ocupa la mayor parte de la cabeza, en la cabeza también se encuentra el acrosoma, una estructura membranosa localizada en la región apical. La parte media del espermatozoide posee una gran cantidad de mitocondrias y la cola o flagelo que varía de longitud dependiendo de la especie (10-100 μm) contiene el axonema y proteínas motoras; los espermatozoides no tienen ribosomas, retículo endoplásmico ni aparato de Golgi ya que este último es el encargado de la formación

del acrosoma durante fases previas de la espermiogénesis (Darszon et al., 2005; Holstein et al., 2003).

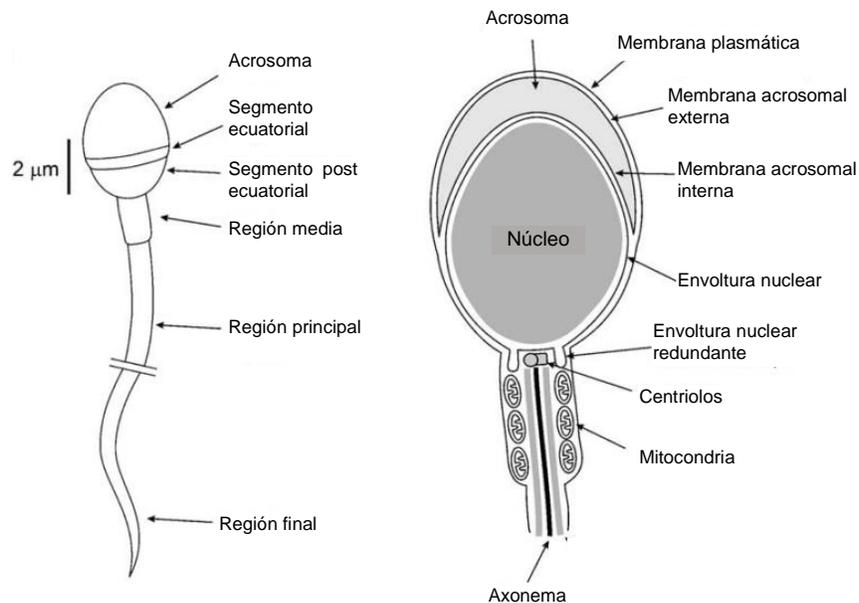


Figura 1. Regiones del espermatozoide. Se muestran las secciones del espermatozoide (cabeza, región media y el flagelo), así como las distintas estructuras contenidas como el acrosoma, el núcleo y las mitocondrias (Modificado de Darszon et al., 2005).

1.1.2 Calidad espermática

La calidad del semen típicamente incluye la evaluación de parámetros macroscópicos como el tiempo de licuefacción, color, viscosidad, pH y volumen, y microscópicos como la aglutinación, concentración, motilidad, morfología y viabilidad. El Manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la evaluación del semen humano es ampliamente utilizado como base en los laboratorios de andrología, pero la interpretación y aplicación de los valores de referencia tienen limitaciones (Cooper et al., 2010). Tradicionalmente, el diagnóstico de infertilidad masculina se ha realizado mediante los parámetros antes mencionados. Sin embargo, estos no evalúan la función espermática y su valor clínico para predecir la fertilidad es cuestionable. En décadas pasadas se han desarrollado pruebas para determinar la función espermática, estas incluyen la evaluación de la capacitación, reacción (RA), interacción con la zona

pelúcida (ZP) e integridad del ADN, sin embargo, pocos han sido adoptados de rutina en la clínica (Lewis, 2007).

El pobre valor del análisis convencional del semen como predictor de la fertilidad ha sido evidenciado en varios estudios, en ellos se concluye que los valores límite establecidos por la OMS para los parámetros de calidad espermática presentan discordancias. Nallella y colaboradores (Nallella et al., 2006) realizaron un estudio en 91 donantes normales y 166 hombres con factor de infertilidad y encontraron que el 28% de los hombres con problemas de infertilidad tenían motilidad normal, comparado con 46% en los hombres fértiles, la concentración espermática fue muy similar en ambos grupos. Por otra parte, Bonde y colaboradores (Bonde et al., 1998) realizaron un estudio en 430 parejas de la población general en las que el mayor volumen, concentración y motilidad no se asociaron con mejores tasas de embarazo con respecto a los individuos con parámetros bajos, por lo cual concluyen que estos parámetros tienen un valor limitado en la predicción del embarazo. Así, los parámetros de calidad deben ser usados con reserva, y existe la necesidad de tener mejores marcadores para evaluar la calidad espermática y desarrollar nuevas metodologías que incluyan la proteómica, metabolómica y la genómica enfocadas a evaluar la funcionalidad del gameto masculino.

1.1.3 Integridad del ADN de los espermatozoides

Existe evidencia de la correlación entre una calidad espermática mala y la fragmentación del ADN, es decir, los hombres infértiles tienen más daño al ADN que los fértiles (Aitken et al., 2009). La etiología del daño al ADN es multifactorial, puede deberse a factores intrínsecos (deficiencia de las proteínas que empaquetan el ADN, incremento en las especies reactivas de oxígeno (EROS) y apoptosis), o extrínsecos (hipertermia testicular, malos hábitos y contaminantes ambientales, entre otros) (Aitken y De Iuliis, 2010).

Estudios realizados sobre la fragmentación del ADN de los espermatozoides evaluada con el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA, *Sperm Chromatin*

Structure Assay) y su relación con el éxito en la fertilización mostraron que los hombres con un índice de fragmentación del ADN (%DFI, *DNA Fragmentation Index*) > 30 ó 40% presentaban una tasa de fertilización menor de 40 y 14%, respectivamente (Evenson, 1999; Spanò et al., 2000). Además de la disminución en la fertilización natural (mayor tiempo para lograr el embarazo) (Spanò et al., 2000), se ha reportado que a mayor porcentaje de DFI menor es el éxito de la inseminación intrauterina (IUI, por sus siglas en inglés), la fertilización *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplásmica (ICSI, por sus siglas en inglés) (Bungum et al., 2004; Evenson y Wixon, 2006). También se ha observado una asociación entre la fragmentación del ADN con alteraciones en el desarrollo y calidad del embrión, así como con problemas en la implantación (Lewis y Aitken, 2005; Simon et al., 2010) y con el riesgo de pérdida del embrión después de la FIV o ICSI (Zini et al., 2008).

Varios estudios reportan que del 25 al 40% de los hombres con calidad de semen dentro de los niveles de referencia de acuerdo a la OMS presentan infertilidad debido a la presencia de fragmentación del ADN espermático (%DFI de 20-30%) (Bungum et al., 2011). Por otro lado, en estudios realizados por Evenson y colaboradores no se observó una asociación entre los parámetros clásicos de la calidad espermática y los parámetros de SCSA (Larson et al., 2000). Por su parte, Virro y colaboradores (Virro et al., 2004) realizaron un estudio prospectivo en 249 parejas bajo tratamiento de FIV o ICSI y reportaron que aquellas parejas con $\geq 30\%$ de DFI tenían riesgo de presentar tasa de fertilización baja y fracaso del embarazo, mientras que los parámetros de la OMS no presentaron correlación con estos eventos. Esto indica que la presencia de fragmentación en el ADN es un parámetro independiente y de mayor valor predictivo que los parámetros establecidos por la OMS.

1.1.3.1 Técnicas que evalúan el daño al ADN

Durante los últimos años se han desarrollado métodos para evaluar la cromatina e integridad del ADN espermático, entre los que se incluyen la técnica de SCSA, el ensayo de TUNEL (*Terminal deoxynucleo-tidyl transferase-mediated dUDP nick-end labelling*), el ensayo cometa o la técnica de dispersión de la cromatina espermática. La técnica de SCSA es una prueba por citometría de flujo que determina la susceptibilidad

del ADN a la desnaturalización ácida *in situ*, empleando al fluorocromo naranja de acridina; el porcentaje de espermatozoides que emite fluorescencia roja representa el índice de fragmentación del ADN (%DFI) y se relaciona con el porcentaje de células con rupturas en el ADN. Se considera que los hombres que presentan valores de %DFI > 25 tienen una fertilización mala y un desarrollo embrionario inadecuado, por lo que este parámetro es reconocido como un buen predictor de una fertilidad exitosa (Evenson, 2013).

La técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) es ampliamente usada y se basa en la unión de dUTP a fosfatos 3'OH terminales incluyendo extremos romos y fragmentos 5' de rupturas simples y de doble cadena del ADN, y tiene un valor de corte de alrededor de 20% como indicador de fertilidad reducida (Sharma et al., 2010). Mientras que, el ensayo cometa se basa en la electroforesis unicelular en gel que cuantifica las rupturas de cadena del ADN en espermatozoides individuales, se pueden cuantificar rupturas de cadena sencilla, doble y bases alteradas. En un estudio reciente se propuso que el riesgo de que no se logre un embarazo aumenta cuando la fragmentación excede un valor umbral pronóstico del 52% (Simon et al., 2011). Otro ensayo utilizado para evaluar el daño genético es la formación de aductos, de tipo arilo/alquilo y oxidante, al crearse un aducto en la base nitrogenada, el enlace glicosil que une la base con el azúcar se debilita. Esto conduce a la formación de un sitio vulnerable de ruptura, este tipo de evaluaciones proporcionan información sobre el origen del daño, como el aducto 8-OHdG (8-hidroxi-2-deoxyguanosina) que provienen del estrés oxidante (Lewis et al., 2013).

1.2 FERTILIZACIÓN

La fertilización es el proceso por el cual se unen el ovocito y el espermatozoide. Se sabe que los espermatozoides pueden llegar al óvulo por quimioatrayentes liberados por las células foliculares que rodean al óvulo como la progesterona, el cAMP y el Ca^{2+} (Okabe, 2013). Se ha observado la presencia de moléculas características de células olfatorias y gustativas involucradas en la captura de los quimioatrayentes en la membrana de los espermatozoides de mamíferos, algunos de estos son los receptores

odorantes (OR) como OR2AE1, OR1D1, β -arrestina, gustducina y proteínas G_{olf} (G_{olf}) (Kaupp et al., 2008).

La fertilización en los mamíferos se divide en 5 pasos: inicialmente, el espermatozoide capacitado y con un acrosoma intacto se une de manera especie-específica a la capa externa del óvulo llamada ZP. Una vez unido a la ZP, el espermatozoide debe pasar por el proceso de RA, penetrar a la ZP, y después alcanzar el espacio perivitelino entre el óvulo y la membrana plasmática. Finalmente, el espermatozoide se une a la membrana del ovocito y se fusiona con ella para entrar al citoplasma de este (**Figura 2**). En este punto, el óvulo ha sido fertilizado y se forma el cigoto (Wassarman et al., 2001).

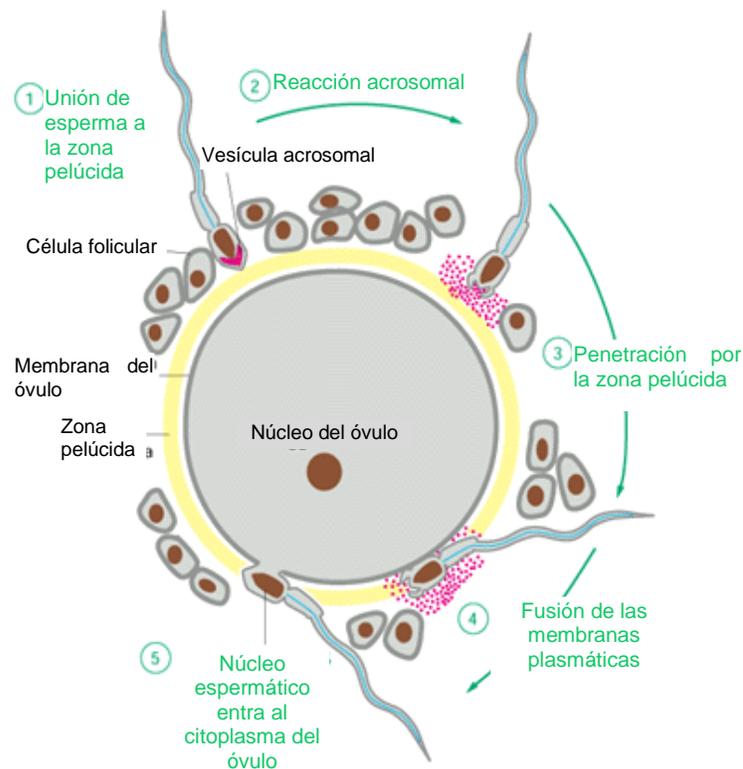


Figura 2. Proceso de fertilización en los mamíferos. Posterior a la capacitación, el espermatozoide llega a la zona de unión en la ZP para llevar a cabo la RA a través de la exocitosis de las enzimas que degradan a la ZP para permitir la unión y fusión del espermatozoide con el óvulo (Modificado de Nixon et al., 2007).

1.2.1 Capacitación de los espermatozoides

La capacitación es el primer proceso que llevan a cabo los espermatozoides para adquirir la capacidad para fertilizar. Las principales respuestas observadas son la adquisición de la hiperactivación de la motilidad espermática y un gran número de modificaciones en la superficie espermática. Estos procesos juntos permiten la unión del espermatozoide a la ZP para posteriormente llevar a cabo la RA (Gadella, 2008). Los cambios bioquímicos que se presentan incluyen: un eflujo del colesterol de la membrana plasmática, ocasionando un incremento en la fluidez de la membrana y la permeabilidad a iones Ca^{2+} , la hiperpolarización de la membrana plasmática, cambios en la fosforilación de proteínas (hiperfosforilación de tirosinas) y actividad de las proteínas cinasas, el incremento en la concentración de bicarbonato (HCO_3^-) y pH intracelular, así como en los niveles de cAMP. Todos estos eventos permiten posteriormente que se lleve a cabo la RA (Ickowicz et al., 2012; Reid et al., 2011).

La regulación de la capacitación *in vivo* involucra mecanismos mediados por receptores y la pérdida de factores discapacitantes de la superficie espermática. Algunas de las interacciones mediadas por receptores son designadas para operar en fases tardías del proceso de capacitación y preparar a la célula para la exocitosis acrosomal, algunos de los ligandos que activan de manera tardía son la progesterona, el factor de crecimiento epidérmico y moléculas de adhesión de células endoteliales. Otros factores endocrinos actúan de manera temprana durante la capacitación y están asignados a promover la supervivencia celular y a impedir la activación de la vía apoptótica, un ejemplo de ésta es la prolactina (Aitken y Nixon, 2013). Los factores discapacitantes se encuentran en la superficie espermática en el tracto masculino y previenen la capacitación prematura de la célula. Algunos de estos factores son el colesterol, inhibidores de proteasas como la *SPINKL* (*proteína inhibidora de proteasas de serina tipo kazal*) (Lin et al., 2008), la proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1 y CRISP1 (*Cysteine-rich secretory protein 1*) (Nixon et al., 2006) y NYD-SP27, una isoforma de la fosfolipasa C zeta 1 localizada en el acrosoma de ratones y humanos (Bi et al., 2009).

1.2.2 Reacción acrosomal (RA)

El acrosoma se forma durante la espermiogénesis, específicamente durante la etapa de espermátide redonda, a partir del aparato de Golgi que en esta fase consiste en un sistema de vesículas cercanas a uno de los polos del núcleo espermático. La formación y evolución del sistema acrosómico tiene lugar durante cuatro fases: la primera o fase Golgi, en donde numerosos gránulos pro-acrosómicos son formados en el Golgi-trans y son acumulados y fusionados en la región medular, estableciendo contacto cercano con la envoltura nuclear. En la segunda o fase de capucha, el gránulo acrosómico formado es agrandado por la adición de nuevas glicoproteínas sintetizadas por el aparato de Golgi, en la tercera o fase acrosómica, el gránulo se envuelve en la membrana acrosomal interna y se vuelve semiesférico, esta estructura se mantiene hasta el final de la fase de maduración en la espermiogénesis y constituye el acrosoma final. Posterior a la formación del acrosoma, se han reportado modificaciones adicionales durante el tránsito epididimal, como es la condensación del acrosoma y modificaciones intra-acrosomales de varios antígenos (Cheng, 2008).

En los espermatozoides humanos, el acrosoma ocupa del 40 al 70% de la cabeza, es considerado un gran gránulo secretorio similar a un lisosoma celular, ya que ambos son derivados del aparato de Golgi y contienen varias enzimas en común como las glicohidrolasas, proteasas, esterases, fosfatasas ácidas y aril sulfatasas. Además, el acrosoma tiene otros rasgos distintivos, es una estructura en forma de saco rodeado de las membranas acrosomal interna y externa. El acrosoma es diferente del lisosoma en que además contiene antígenos como la acrosina, acrogranina y la proteína espermática AM67 (Abou-Haila y Tulsiani, 2000).

La liberación de las enzimas proteolíticas e hidrolíticas durante la interacción del óvulo y el espermatozoide es a través del proceso de exocitosis conocido como RA, la cual es esencial para la penetración del espermatozoide al óvulo. La RA también resulta en la modificación de algunas proteínas de la membrana de la región ecuatorial y post-acrosomal necesaria para la fusión con la membrana del óvulo (Patrat et al., 2000). La exocitosis del acrosoma de los mamíferos está asociada con el incremento de Ca^{2+}

intracelular, de manera similar a lo observado en las vesículas sinápticas. La hipótesis de los complejos SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*), sugiere que un SNAP (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein*) presente en la vesícula, o en el caso del acrosoma en la membrana acrosomal externa, nombrada v-SNARE, interactúa con moléculas complementarias en la membrana plasmática nombradas t-SNARE. Esta interacción provoca la fusión y el acoplamiento de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa seguida de la liberación del contenido acrosomal. Los complejos SNARE que se han observado en la RA involucran a proteínas como syntaxina, rab3, complexinas y SNAP25. La complexina 1 se ha sugerido como esencial para la formación del complejo SNARE, ya que en ausencia de la misma no se lleva a cabo la RA (Tardif y Cormier, 2011; Zhao et al., 2007).

Se ha identificado la importancia de conocer la capacidad de una muestra espermática para llevar a cabo la RA, y como ayuda para la decisión clínica de realizar una FIV convencional o recurrir directamente a la ICSI. En un estudio realizado en 40 pacientes con aparente calidad espermática buena de acuerdo a los parámetros de la OMS, se evaluó la RA y se identificó que el 92% de las muestras con RA espontánea (RAe) baja (es decir espermatozoides que pierden el acrosoma de manera prematura durante la capacitación) tenían una tasa de fertilización mayor comparada con el grupo que presentó RAe alta (> 10% de espermatozoides sin acrosoma), en quienes únicamente el 39.3% de los pacientes tuvo fertilización buena (mayor al 35% de óvulos con 2 pronúcleos) ($p = 0.004$); con estos datos, los autores encontraron un valor de predicción negativo de 92%, especificidad de 50% y sensibilidad de 94% (Wiser et al., 2014). Otros estudios han reportado que aquellos pacientes con 10% de RA inducida (RAi) con un ionóforo de Ca^{2+} logran al menos el 30% de óvulos fertilizados (Carver-Ward et al., 1996a, 1997; Cummis et al., 1991)

1.3 INFERTILIDAD MASCULINA

De acuerdo con la OMS, la infertilidad es un padecimiento asintomático que se diagnostica cuando no se ha podido culminar exitosamente un embarazo después de mantener relaciones sexuales sin protección y de manera regular por lo menos durante

un año, en el caso de parejas menores de 35 años, mientras que en las parejas mayores a esa edad, el tiempo considerado es de 6 meses (WHO, 2010). Se considera que 1 de cada 20 hombres en edad reproductiva sufren de infertilidad; en un meta-análisis realizado en 1992 se estimó que en los países occidentales había una disminución en la cuenta espermática de 1% por año durante los últimos 50 años (Carlsen et al., 1992), dato que fue apoyado por estudios posteriores (Irvine et al., 1996; Sharpe, 1995).

Actualmente se considera que cerca del 15% de las parejas sexualmente activas son infértiles y en general, hasta el 50% de los casos de infertilidad pueden deberse al factor masculino, sin embargo estos porcentajes varían en distintas regiones del mundo (Agarwal et al., 2015). La gran mayoría de los sujetos infértiles presentan un número suficiente de espermatozoides, sin embargo, no son funcionales por razones que no han sido establecidas. La patogénesis de la infertilidad masculina puede ser debida a la falla en la espermatogénesis por desórdenes hormonales, aplasia de las células germinales, varicocele, defecto en el transporte espermático por anomalías congénitas, factores inmunológicos y por factores ambientales, y en la mayoría de los casos involucra la combinación de varios de estos factores (Aitken et al., 2014).

1.3.1 Técnicas de reproducción asistida (ART)

Las ART incrementan la probabilidad de fertilización, ya que llevan directamente al espermatozoide cerca o incluso dentro del óvulo, evitando así las barreras naturales para que los espermatozoides puedan unirse o penetrar al óvulo. La IUI (Inseminación Intraúterina) y la FIV con transferencia del embrión son las técnicas más frecuentes para el tratamiento de la infertilidad masculina y en último lugar, cuando la calidad espermática es muy pobre o porque ha fracasado la FIV, se usan otras técnicas como la microinyección de un solo espermatozoide directamente en el citoplasma del óvulo (ICSI) (Walls et al., 2012). Recientemente se han desarrollado nuevos métodos, como la separación de células espermáticas activadas magnéticamente (MACS, por sus siglas en inglés) que puede separar células apoptóticas o el examen de la morfología

de los organelos espermáticos móviles (Stimpfel et al., 2018; Zanetti et al., 2018), o el ICSI fisiológico (PICS) para la selección de espermatozoides que se unen al ácido hialurónico que ha mostrado varias ventajas sobre el ICSI y FIV convencionales, como tasas altas de fecundación, fragmentación de blastocitos y de embarazo en humanos (Erberelli et al., 2017).

Los ovocitos usados en las ART son obtenidos quirúrgicamente de los folículos en ciclos superovulatorios a través del tratamiento con gonadotropinas y mediante ultrasonografía de los ovarios. La administración de la gonadotropina coriónica humana se programa cuando los folículos tienen un diámetro ≥ 18 mm y una vez colectados se evalúa la presencia del cúmulo de masa en el fluido folicular obtenido que puede contener al ovocito, y este se mantiene en medio de cultivo hasta el momento de la fertilización (Merchant et al., 2011). En la FIV, cada ovocito es inseminado con 50,000-100,000 espermatozoides motiles, mientras que en la ICSI se utiliza un solo espermatozoide inyectado directamente en el citoplasma del ovocito (Braude y Rowell, 2003). La inseminación es detectada de 12-20 h después de la inseminación por la presencia de los dos pronúcleos formados en el citoplasma del ovocito que corresponden al material paterno y materno, y por la presencia de dos cuerpos polares en el espacio perivitelino. Posterior a las 24 h, las membranas pronucleares se disuelven permitiendo la combinación del material genético de los padres y continua hacia la primera división mitótica, y las subsecuentes divisiones ocurren en intervalos de 24 h. Generalmente de 2 a 3 blastocistos de 6 a 8 células son transferidos al útero en el tercer día después de la inseminación (Hollingsworth et al., 2007) .

1.4 DAÑO OXIDANTE Y LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA

Las EROS son importantes mediadores de la función espermática y están involucradas en la capacitación, RA y fusión al óvulo. Sin embargo, muchas de las alteraciones espermáticas en la infertilidad han sido recientemente relacionadas con el proceso de maduración espermática y con la presencia de altos niveles de EROS (Iammarrone et al., 2003) (**Figura 3**). Un incremento en la producción de EROS resulta en el daño

oxidante a los lípidos, proteínas y ADN, lo cual lleva a la disminución de la motilidad espermática, daño a las membranas acrosomales y la inhabilidad del espermatozoide de fertilizar al óvulo o producir un embarazo viable (Aitken et al., 2012). Además, se sabe que las EROS causan daño al ADN, tanto en el genoma mitocondrial como nuclear de los espermatozoides humanos, que finalmente resulta en su fragmentación; se ha reportado la formación de aductos oxidados 8-OHdG en el ADN como consecuencia del estrés oxidante (Gharagozloo y Aitken, 2011).

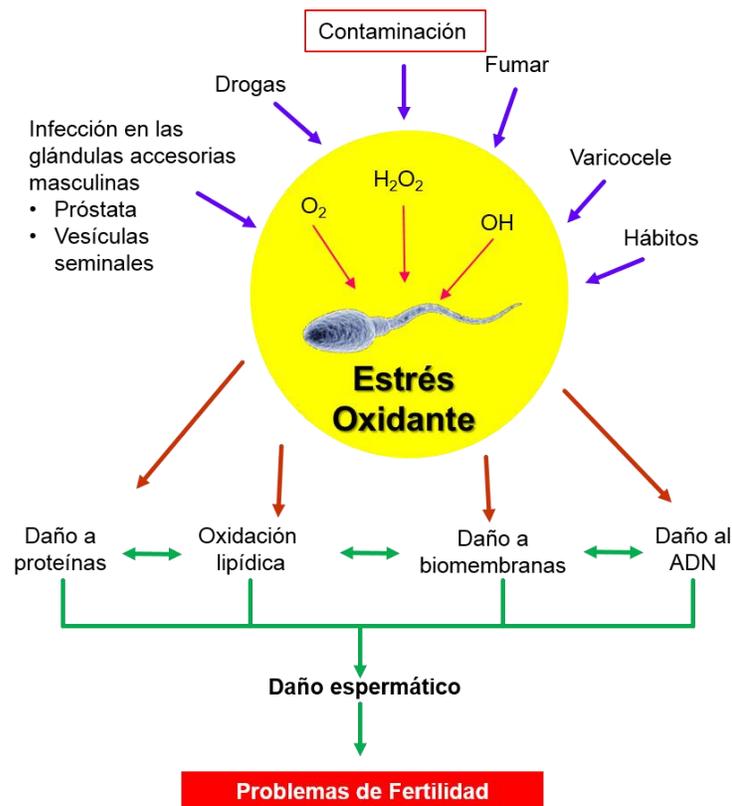


Figura 3. Fuentes de EROS que contribuyen al desarrollo de problemas de fertilidad. (Modificado de Cocuzza et al., 2007)

Los espermatozoides son particularmente vulnerables al daño oxidante debido a que contienen ácidos grasos poliinsaturados, particularmente el ácido docosahexaenoico y pocas enzimas antioxidantes capaces de contrarrestar a las EROS. La peroxidación lipídica altera la función espermática, interfiriendo con la RA y la capacidad de fusión espermatozoide-óvulo (Aitken et al., 2014). Se ha reportado que los niveles de

malondialdehído (MDA), producto de la lipoperoxidación son hasta 2 veces más elevados en hombres astenospermicos (con $\leq 40\%$ de espermatozoides móviles) y oligospermicos (con $\leq 20 \times 10^6$ espermatozoides/ml) comparados con los normospermicos (con mínimo 20×10^6 espermatozoides/ml), y la motilidad de los espermatozoides se mejoró después del tratamiento con la vitamina E, lo que indica que la lipoperoxidación es un fenómeno que afecta la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Suleiman et al., 1996).

1.4.1 La exposición ambiental a compuestos pro-oxidantes y su efecto sobre la fertilidad masculina

Existe evidencia de que un número elevado de contaminantes ambientales interfiere con la calidad y función espermáticas en la población masculina, sin embargo, el agente causal es difícilmente identificado debido a que generalmente la exposición es a varios contaminantes a la vez. Los principales contaminantes ambientales atmosféricos que por su naturaleza pueden inducir estrés oxidante son el dióxido de sulfuro (SO_2), óxidos nitrosos (NO_x), material particulado (PM, por sus siglas en inglés) y ozono (O_3) (Jurewicz et al., 2009). Varios estudios han relacionado la exposición a estos contaminantes y la calidad espermática. En un estudio realizado en 1346 voluntarios de Chongqing, China, una de las ciudades más contaminadas del mundo, observaron que las concentraciones de PM_{10} (PM de diámetro aerodinámico $>10 \mu\text{m}$), SO_2 y NO_2 afectaron de manera significativa la calidad espermática (Zhou et al., 2014). De manera similar, el análisis de semen de 5134 donadores de la zona de Los Ángeles en Estados Unidos indicó que existe una correlación negativa entre los niveles de O_3 y la calidad espermática (Sokol et al., 2006).

Por otro lado, el humo del cigarro contiene una gran diversidad de compuestos altamente oxidantes que se han asociado con una disminución de la calidad y función espermáticas, así como daño al ADN (Merino et al., 1998; Shen et al., 1997; Sofikitis et al., 1995). Un estudio piloto en hombres infértiles fumadores ($n = 20$), infértiles no fumadores ($n = 32$) y sanos no fumadores ($n = 13$) mostró que el hábito de fumar se

relacionó con un aumento de 107% en los niveles de EROS ($p = 0.001$) y una depleción significativa de los niveles de antioxidantes ($p = 0.003$) (Saleh et al., 2002).

De igual manera, varios metales son considerados contaminantes altamente oxidantes, incluyendo el hierro, cobre, níquel, plomo y cadmio, los cuales incrementan la producción de EROS, disminuyen el glutatión y otros antioxidantes, generan lipoperoxidación de la membrana celular, causan apoptosis y daño oxidante al ADN. Finalmente, otro grupo de compuestos con capacidad oxidante son los plaguicidas, entre ellos los insecticidas organofosforados que alteran la estructura del espermatozoide, disminuyen la capacidad de fertilizar y causan daño oxidante en el ADN (Piña-Guzmán et al., 2006).

1.5 JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, los problemas de fertilidad en las parejas han ido en aumento; se reporta que cerca del 15% de las parejas sexualmente activas son infértiles y el 50% de los casos de infertilidad son debidos al factor masculino. La exposición a contaminantes ambientales (PM, O₃, metales pesados y plaguicidas, entre otros) se considera uno de los factores que contribuyen con los problemas en la reproducción humana. Se ha observado que la disminución en la capacidad de fertilización de los espermatozoides se debe a un daño en macromoléculas como el ADN, lípidos de membrana y proteínas. El aumento en el número de casos de infertilidad en los últimos años ha llevado a la necesidad de recurrir a ART. Hasta el momento, los parámetros de diagnóstico de la calidad espermática (viabilidad, motilidad, concentración y morfología espermáticas) para llevar a cabo la selección de los espermatozoides para la fertilización no son eficientes, ya que hay espermatozoides con aparente buena calidad que no logran fertilizar. Esto hace necesario el contar con métodos más eficaces para evaluar la calidad del gameto masculino, como es el nivel de daño al ADN y la capacidad fertilizante de los espermatozoides, a través de evaluar la fragmentación del ADN y la capacidad para llevar a cabo la RA y su utilidad para predecir el potencial fértil masculino. De igual manera, fue de nuestro interés establecer la posible asociación entre los parámetros evaluados con los niveles de

especies oxidantes en los espermatozoides, lo que permitirá sugerir un factor ambiental en la falla en la fertilización.

1.6 HIPÓTESIS

La evaluación de la función espermática mediante la RA, la fragmentación del ADN y/o el estrés oxidante serán predictores del éxito en la fertilización y viabilidad de los blastocistos.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo general

Evaluar la función acrosomal, la fragmentación del ADN y el estrés oxidante en el espermatozoide y su utilidad como predictores del potencial fértil masculino a través del éxito en la FIV.

1.7.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la calidad espermática de los participantes.
2. Determinar la función espermática mediante la RA.
3. Evaluar la integridad de la cromatina de los espermatozoides de los participantes.
4. Determinar el estrés oxidante en los espermatozoides de los participantes.
5. Evaluar la asociación de la RA, fragmentación del ADN y estrés oxidante con el éxito en la fertilización y la viabilidad del blastocisto.
6. Explorar la asociación entre la fertilidad y los parámetros de calidad espermática (EROS, fragmentación del ADN, RA) con factores de riesgo ambientales.
7. Desarrollar una ecuación para predecir de manera individual el potencial fértil masculino (tasa de fertilización y viabilidad del embrión).

2. MÉTODOS

2.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio epidemiológico de tipo transversal con la colaboración del Instituto Ingenu México. Se tuvo una muestra de 69 participantes con indicación para someterse a un procedimiento de FIV, este tamaño de muestra permitió un poder estadístico del 85% calculado a partir de la asociación de la RA con la fertilización y del 87% para la asociación del %DFI con blastocistos viables. El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética del Instituto Ingenu (Anexo 1) y las cartas de consentimiento firmadas por los participantes.

Se aplicó un cuestionario a todos los participantes para conocer la historia clínica y la posible exposición a contaminantes ambientales (factores endógenos y exógenos) en el cual se incluyeron las siguientes variables: ejercicio, obesidad, consumo de medicamentos, drogas, anabólicos y antioxidantes, uso de baños saunas, padecer diabetes, hipertensión, enfermedades venéreas, infecciones genitales, inflamación de la próstata y varicocele, presentar golpes testiculares, etc. Dentro de la exposición ambiental se incluyeron variables como vivienda en zonas contaminadas, cercanía de la vivienda o trabajo a vialidades altamente transitadas, a talleres de hojalatería o a talleres mecánicos, tabaquismo, tabaquismo pasivo, consumo de alimentos a la parrilla o cocinados en loza vidriada, tipo y tiempo de transporte utilizado, exposición a plaguicidas, metales, hidrocarburos, pinturas, solventes.

2.1.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron hombres en edad reproductiva (hasta 55 años) sometidos a FIV que firmaron la carta de consentimiento informado y respondieron el cuestionario. Se incluyeron a pacientes con indicación para el uso de óvulos provenientes de donantes saludables, menores de 30 años y con fertilidad probada (embarazo previo).

2.1.2 Variables independientes y dependientes del estudio

Como variables dependientes se consideraron la función acrosomal, la integridad de la cromatina y las EROS. Como variables independientes se tomó la tasa de fertilización y la tasa de blastocistos viables.

2.1.3 Variables confusoras y covariables en el éxito de la fertilización y desarrollo de blastocistos viables.

Se consideraron como covariables a la exposición a contaminantes de tipo oxidante como la ocupación, consumo de alimentos a la parrilla, lugar de residencia, cercanía de la vivienda a fábricas o negocios con emisiones de contaminantes, hábitos como el tabaquismo, etc. Como variables confusoras se consideraron a los factores que pueden modificar el éxito en la fertilidad como son la edad, índice de masa corporal (IMC), consumo de antioxidantes, enfermedades crónicas, etc.

2.2 Recolección de las muestras

Se obtuvo una alícuota de la muestra del semen de cada participante utilizada para el procedimiento FIV con concentración espermática y volumen suficientes, a criterio del Instituto Ingenes, para realizar los análisis descritos en la **Figura 4**.

2.3 Determinación de la calidad espermática

La calidad espermática se obtuvo de la evaluación realizada por el Laboratorio de Andrología del Instituto Ingenes, de acuerdo a los parámetros establecidos por la OMS (OMS, 2010), y para el diagnóstico se consideraron los valores de referencia para cada parámetro: volumen (1.5 ml), concentración (15×10^6 espermatozoides/ml), cuenta total (35×10^6 espermatozoides), motilidad (32%), morfología de acuerdo a los criterios de Kruger (4%), pH (> 7.1), viabilidad (35%) y concentración de leucocitos ($< 1 \times 10^6$ /ml).

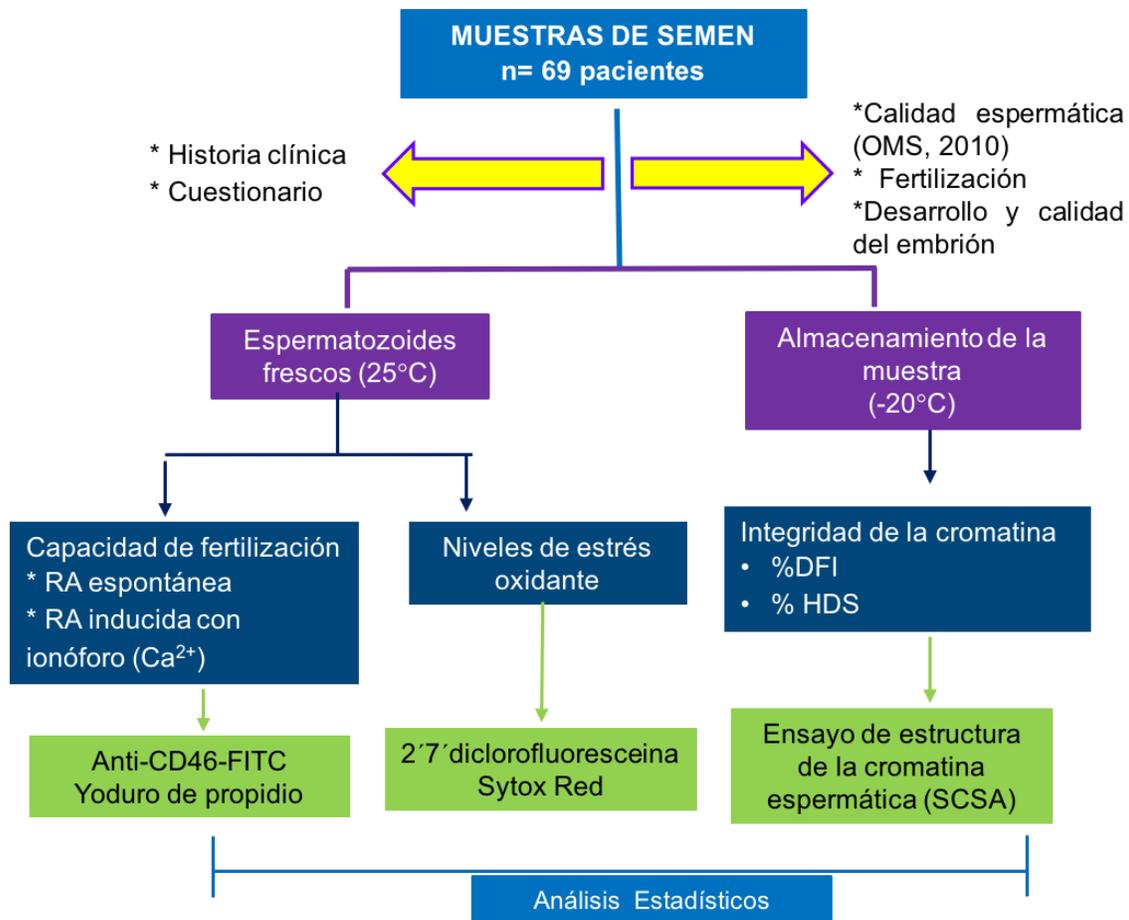


Figura 4. Diagrama de la estrategia experimental. RA: Reacción acrosomal, SCSA: *Sperm Chromatin Structure Assay*; DFI: *DNA Fragmentation Index*; HDS: *High Density Staining*.

2.4 Capacitación espermática

Se siguió la técnica de centrifugación en gradiente de acuerdo con la OMS (OMS, 2010).

2.4.1 Principio

La técnica de centrifugación en gradiente permite separar a los espermatozoides por centrifugación a través de capas de un coloide, debido a la diferencia de densidad de los diferentes componentes seminales, la motilidad y la morfología de los espermatozoides. Los más móviles (tipos A y B, progresivo rápido y progresivo lento, respectivamente) conseguirán atravesar más rápidamente las diferentes capas de los gradientes hasta situarse en el fondo, mientras que los tipos C y D (lentos y sin

desplazamiento, e inmóviles, respectivamente), junto con otros componentes seminales (restos celulares, plasma seminal) quedan en las capas superiores del gradiente (OMS, 2010).

2.4.2 Procedimiento

Se capacitaron dos muestras de cada paciente, una correspondiente a 10×10^6 espermatozoides para la evaluación de la RA y el resto de la muestra para FIV. Se realizó la preparación de los gradientes de densidad (45 y 90%) utilizando PureSperm® 100 (Nidacon Internacional, Mölndal, Suecia) y medio de Fluido Tubal Humano (HTF, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA). La separación en gradiente en mini Percoll se realizó de la siguiente manera: se colocó 200 μ l de la fase de 90% y se adicionó lentamente 200 μ l de la fase de 45% en un ángulo de 45°, sin que se mezclaran. Se adicionó la alícuota de semen correspondiente a 6×10^6 espermatozoides y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante dejando alrededor de 20 μ l de la suspensión, se lavó con 1 ml de medio HTF suplementado con albúmina de suero humano al 10% (HSA, Invitrocare, Frederick, MD, EUA), se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante. Al botón celular se le adicionó 400 μ l de medio HTF- HSA 10% durante 2 h en un ángulo de 45° a temperatura ambiente para su capacitación y posterior uso para la RA o fertilización.

2.5 Fertilización *in vitro*

2.5.1 Principio

Se siguieron los protocolos establecidos por el Instituto Ingenes para la obtención de óvulos y fertilización *in vitro*.

2.5.2 Estimulación ovárica para la donación de ovocitos

Las mujeres donadoras fueron sometidas a estimulación ovárica mediante una administración diaria (8-14 días, promedio de 10 días) de antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (según disponibilidad): 0.25 mg/día Cetrotrelix (Cetrotide, Merck Laboratory Darmstadt, Alemania) ó 0.25 mg/día de acetato de

Ganirelix (Orgalutran Laboratory MSD, Kenilworth, NJ, USA) en la fase lútea después de la menstruación. Las gonadotropinas se ajustaron de acuerdo con los niveles séricos de estradiol y la medición del diámetro folicular cada 2-3 días por ultrasonido vaginal. La estimulación se prolongó hasta que el diámetro de los folículos principales fue >18 mm (18-22 mm). Después se administró gonadotropina coriónica humana recombinante (hCG) (Choragon 1000 IU, Laboratorio Ferring, Saint-Prex, Suiza) y se recuperaron los ovocitos después de 36 h mediante ecografía. Todos los folículos de 14-18 mm fueron aspirados y se asignó un promedio de 12.3 ± 4.8 ovocitos a cada participante.

2.5.3 Cultivo de embriones

Las muestras de semen se capacitaron como se describió previamente (ver sección 2.4). La fertilización se realizó de la siguiente manera: los ovocitos donados (12.3 ± 4.8 por participante) fueron inseminados 4 h después de la cosecha con aproximadamente 100,000 espermatozoides capacitados por ovocito en una placa previamente preparada con medio Global Total (LifeGlobal; Petersburg, FL, USA) y una gota de aceite mineral se coincubaron durante 19 h en 8% de CO₂, 5% de O₂ a 37 °C y la fertilización fue considerada como positiva por la formación de los pronúcleos. La fertilización se consideró normal si se identificaron dos pronúcleos y dos cuerpos polares, mientras que los ovocitos sin pronúcleos visibles no fueron fertilizados, y aquellos con un solo pronúcleo o más de dos pronúcleos se consideraron como fertilizados de manera anormal. Los embriones se cultivaron en medio Global Total y se incubaron a 37 °C en 8% de CO₂ hasta la etapa de blastocisto. La calidad del embrión se controló según los criterios de morfología: número de blastómeros y ritmo de división, porcentaje y tipo de fragmentación, visualización de los núcleos, presencia de halo o vacuolas en el citoplasma, grosor de la zona pelúcida y grado de compactación y simetría. Los blastocistos clasificados como 1 y 2 se consideran con calidad óptima y capacidad de implantación máxima/buena, los blastocistos de grado 3 calidad intermedia y los blastocistos clasificados como 4 se consideraron de mala calidad con baja probabilidad de implantación. En este estudio, los blastocistos de grados 1-3 se consideraron viables y adecuados para la transferencia. Un embriólogo

monitoreó y registró diariamente la información sobre la fecundación y la calidad del embrión.

2.6 Evaluación de la reacción acrosomal

2.6.1 Principio

Se utilizó el anticuerpo anti CD46, el cual reconoce a la proteína CD46 localizada exclusivamente en la membrana acrosomal interna del espermatozoide, por lo que solo reacciona cuando se ha perdido el contenido acrosomal, ya sea de manera espontánea o después de la inducción *in vitro* de la RA con un ionóforo de Ca^{2+} (Carver-Ward et al., 1996a).

2.6.2 Procedimiento

Una vez recuperados los espermatozoides por el método del gradiente de Percoll y capacitados (6×10^6 células iniciales) (Ver sección 2.4) se separaron en cuatro tubos (100 μl cada uno). A dos de los tubos se les adicionó 10 μl del anticuerpo anti CD46-FITC (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) por 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente se realizó un lavado con medio HTF y centrifugación a 1500 rpm/5 min a temperatura ambiente. El botón se suspendió en 300 μl de PBS y se le agregó yoduro de propidio como marcador de viabilidad (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA). Este procedimiento se realizó para evaluar la RA espontánea (RAe), la cual indica la pérdida prematura del acrosoma. Para determinar la RA inducida *in vitro* (RAi), la cual representa la funcionalidad del acrosoma como respuesta a un inductor, posterior a la capacitación, a los dos tubos restantes se les realizó un lavado con 500 μl de HFT sin HSA, debido a que ésta puede tener afinidad por el inductor (Tateno et al., 2013) y se centrifugó a 1500 rpm/5 min. Una vez retirado el sobrenadante se adicionó un ionóforo de Ca^{2+} (A23187, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) inicialmente diluido en DMSO (1 mg/ml), después a una concentración final de 20 μM diluido en medio HTF sin albúmina y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado con medio HTF y centrifugación a 1500 rpm/5 min a temperatura ambiente y se realizó el marcaje con el anticuerpo CD46-FITC y yoduro de propidio como se describió anteriormente para la RAe.

La evaluación se realizó mediante citometría de flujo con el equipo BD Accuri™ C6, el registro de la fluorescencia verde (FITC) se realizó a través de un filtro de 488 nm, mientras que el registro de la fluorescencia roja (YP) a través de un filtro de 575 nm. Se evaluaron 10,000 eventos por duplicado para ambos parámetros y se expresaron en porcentaje: RAe y RAi. Como control se analizó una muestra blanco de cada paciente para la localización de la población y el registro de la auto fluorescencia de la muestra. El resultado de espermatozoides sin acrosoma es representado por el porcentaje de células vivas positivas a FITC (acrosoma ausente). También se consideró el índice de respuesta del acrosoma al reto con ionóforo (ARIC: *Acrosome Response to Ionophore Challenge*) correspondiente a la RAi menos la RAe.

2.7 Evaluación del daño al ADN

Se empleó la técnica de SCSA mediante citometría de flujo (Evenson, 2013).

2.7.1 Principio

La técnica de SCSA se basa en la detección de la fragmentación del ADN espermático y la condensación de la cromatina mediante citometría de flujo empleando el fluorocromo catiónico naranja de acridina (NA); la NA emite fluorescencia verde al unirse a la doble cadena del ADN (ADN íntegro) y de color rojo al intercalarse con la hebra sencilla (ADN dañado) (Evenson, 2013).

2.7.2 Procedimiento

Se tomó una alícuota de 2×10^6 espermatozoides diluida en 1 ml del amortiguador TNE (Tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.15 M, EDTA 1mM, pH 7.4 a 4 °C) que se resguardó a -70 °C hasta su análisis. Una vez descongelada la muestra a 37 °C, se tomó 200 µl de la suspensión y se le agregó 400 µl de la solución de detergente ácido (NaCl 0.15 M, HCl 0.08 N, Tritón X-100 0.1%, pH 1.2 a 4 °C). Treinta segundos después se agregó 1.2 ml de la solución de tinción de NA (6 µg/ml a 4 °C). Para la preparación correcta de los reactivos ver Evenson (2013). Transcurridos 3 min de la reacción, la muestra se analizó por citometría de flujo manteniendo la ubicación de la población principal en los canales 450 ± 5 para FL1 (verde) y 125 ± 5 para FL3 (rojo), y un flujo bajo < 200 células/seg. Se evaluaron 5,000 eventos por duplicado de cada muestra y se

analizaron mediante el *Software* SCSA®. El resultado se reportó como el porcentaje de células con índice de fragmentación del ADN (%DFI) y de espermatozoides con alta tinción del ADN (%HDS).

2.8 Evaluación de los niveles de EROS en los espermatozoides

2.8.1 Principio

Se utilizó la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) como indicador de la formación de EROS; la DCFH-DA es permeable a la célula y por acción de las esterasas celulares sufre una ruptura en el grupo diacetato, formando el DCFH, el cual es oxidado en presencia de EROS como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y forma un producto altamente fluorescente llamado diclorofluoresceína (DCF), el cual es detectado por citometría de flujo a una longitud de onda de 498/522 de excitación/emisión, respectivamente.

2.8.2 Procedimiento

Se tomó una alícuota de semen correspondiente a 0.5×10^6 espermatozoides que fue incubada en 500 µl de PBS y 2.5 µl de la sonda DCFH-DA (5 µM concentración final) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA), al mismo tiempo se adicionó 0.5 µl de un marcador de viabilidad, SYTOX® Red (5 nM concentración final, Molecular Probes®, Eugene, OR, USA). Se evaluaron 10,000 eventos por citometría de flujo con el equipo BD Accuri™ C6, el registro de la fluorescencia de la DCF se realizó con un filtro de 488 nm (FL1-FITC), mientras que para el registro de la fluorescencia de SYTOX® Red se utilizó un filtro de 635 nm (FL4-APC). Como resultado se consideró la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células positivas para la DCF (EROS) y negativas para SYTOX® Red (vivas) obtenidas con el *software* BD Accuri C6.

2.9 Análisis estadístico

Se realizó la estadística descriptiva (porcentajes, mediana y/o media ± DE o EE) para las características generales de los participantes, los parámetros de calidad espermática de la OMS y los parámetros de función: RA, integridad de la cromatina espermática y EROS. La asociación de los parámetros analizados con la fertilización

y la viabilidad del embrión se evaluó a través de una regresión lineal simple. Se realizaron análisis de regresión lineal multivariada, incluyendo las variables que en las regresiones lineales simples resultaron asociadas con la tasa de fertilización o blastocistos viables.

A partir de los modelos multivariados finales se desarrollaron los modelos logit, categorizando la variable de fertilización en ≥ 60 y $< 60\%$ y la variable de blastocistos viables en ≥ 40 y $< 40\%$. A partir de los valores de las betas (β) del modelo logit se usó la función logística para desarrollar la ecuación de predicción para la probabilidad de tener fertilización $\geq 60\%$ y/o blastocistos viables $\geq 40\%$ de cada paciente utilizando la siguiente función:

$$\hat{p} = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n}}$$

En donde:

β = probabilidad de tener fertilización $\geq 60\%$ y/o blastocistos viables $\geq 40\%$

β_0 = beta constante del modelo (probabilidad basal de que el evento ocurra cuando X_1, X_2, X_3, \dots tengan valor cero)

$\beta_{1,2,3, \dots}$ = beta correspondiente a cada variable incluida en el modelo logit

$X_{1,2,3, \dots}$ = resultado del paciente para cada variable del modelo

A partir de una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) se probaron diversos puntos de corte para determinar si la probabilidad dada por la fórmula se clasificaba como positiva. Se obtuvieron los valores del área bajo la curva, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), falsos positivos y falsos negativos para el modelo logit de fertilización y blastocistos viables. Por otro lado, se realizaron modelos de regresión lineal simple y multivariada para explorar si los factores de riesgo ambientales se asociaban con la alteración en los parámetros de función espermática (RA, integridad de la cromatina y EROS) o con la fertilización y viabilidad del embrión. Se estableció un valor de significancia de $p \leq 0.05$ en todos los análisis estadísticos y se utilizó el paquete estadístico STATA v. 12.0 (Stata Corp, College Station, TX).

3. RESULTADOS

3.1 Características generales de la población de estudio

La población participante fue de 89 pacientes de Ingenes, de los cuales 20 fueron excluidos del estudio debido a que no respondieron el cuestionario o a que el procedimiento de reproducción asistida fue cambiado de FIV a ICSI a criterio de los biólogos del laboratorio, por lo que la población final fue de 69. La tasa de respuesta del estudio fue de 86%. La media de edad de los participantes fue de 40.05 ± 6.08 años, en un rango de 28 a 55 años; el peso medio fue de 85.17 ± 14.03 kg y la talla de 1.73 ± 0.06 m, como resultado, considerando el índice de masa corporal (IMC), 11.6% de los participantes tuvo peso normal, mientras que 88.4% estaba en sobrepeso u obesidad. El 56.5% de los participantes residían en la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) al menos durante el último año; 78.2% tuvo un nivel escolar de licenciatura-posgrado, 14.5% tenía una carrera técnica o preparatoria, mientras que el resto de los participantes concluyó al menos el nivel de secundaria. Ninguno de estos parámetros resultó asociado con la fertilidad masculina en este estudio.

En cuanto a los datos de FIV, estos se muestran en la **Tabla 1**. La media de óvulos utilizados para cada paciente fue de 12.34 ± 4.85 , los cuales fueron donados por mujeres sanas con probada fertilidad, con una media de edad de 24.6 ± 3.2 años; el porcentaje de fertilización fue de $60.3 \pm 20.2\%$, y de estos cigotos, únicamente $49.8 \pm 31.3\%$ lograron un desarrollo viable para su transferencia o congelación.

3.2 Calidad de semen de acuerdo con los parámetros de la OMS y su asociación con la fertilidad

La muestra de semen empleada para las determinaciones de este estudio se tomó del semen utilizado por el laboratorio de andrología para el procedimiento FIV, por esta razón, los resultados de la espermato-bioscopía se consideraron de la muestra fresca, incluyendo el volumen, concentración espermática, cuenta total, motilidad, morfología, pH y concentración de leucocitos, mientras que el resultado de la viabilidad de los

espermatozoides se tomó del análisis de citometría de flujo empleando la sonda Sytox Red®. Los valores de la media para cada parámetro evaluado se muestran en la **Tabla 2**. En cuanto al diagnóstico de acuerdo con los valores normales de la OMS (2010), 66.7% de los pacientes fueron normospermicos, 26.1% teratospérmicos (morfología normal baja), 5.8% astenoteratospérmicos (motilidad y morfología normal baja), mientras que sólo 1.4% presentaron hipospermia (volumen bajo).

Tabla 1. Resultados del procedimiento FIV de los participantes.

Variable	Media ± DE	Rango
Óvulos donados	12.3 ± 4.8	2 - 24
Fertilización (%)*	60.3 ± 20.2	18.7 - 100
Blastocistos viables (%)**	49.8 ± 31.3	0 - 100

*Definida como los óvulos que muestran 2 pronúcleos y 2 cuerpos polares. **Blastocistos viables en el día de la transferencia con respecto a la tasa de fertilización.

Tabla 2. Resultados de la calidad de semen de los participantes.

Parámetro	Media ± DE	Rango	Valor de la OMS*
Volumen (ml)	2.8 ± 1.24	1.2 - 6.6 ⁺	1.5
Concentración (x10 ⁶ /ml)	77.8 ± 44.16	16 - 230	15
Cuenta total (x 10 ⁶)	231.8 ± 177.86	36 - 1016	35
Motilidad (%)	52.6 ± 16.35	6-78 ⁺	32
Morfología (%)	3.7 ± 1.47	1 - 7 ⁺	4
pH	8.4 ± 0.57	7 - 9 ⁺	>7.1
Viabilidad (%)	75.6 ± 10.69	53.8 - 93.4	35
Leucocitos (1x10 ⁶ /ml)	0.5 ± 0.61	0 - 3.5 ⁺	<1

* Valores de referencia de la OMS, ⁺Parámetros en los cuales uno o más participantes se encontraron fuera de los valores de referencia. n = 69

Se realizó un análisis de regresión para determinar la asociación entre la calidad espermática evaluada por los criterios de la OMS con los resultados del tratamiento

FIV (Tabla 3); únicamente la morfología se asoció positivamente con la tasa de fertilización.

Tabla 3. Asociación bivariada entre los parámetros de la OMS y FIV.

Variable	Coeficiente beta /R ²	
	Fertilización (IC95%) ⁺	Blastocistos viables (IC95%) ⁺
Volumen (ml)	0.86 / 0.003 (-3.09, 4.81)	-2.55 / 0.010 (-8.67, 3.56)
Concentración (x10 ⁶ /ml)	-0.02 / 0.000 (-0.10, 0.11)	0.09 / 0.020 (-0.07, 0.26)
Cuenta total (x10 ⁶)	0.00 / 0.003 (-0.02, 0.03)	-0.04 / 0.000 (-0.03, 0.04)
Motilidad (%)	3.19 / 0.000 (-0.31, 0.37)	-0.13 / 0.003 (-0.66, 0.40)
Morfología (%)	3.56 / 0.054 (0.05, 7.18) *	-2.75 / 0.013 (-8.48, 2.98)
Viabilidad (%)	0.20 / 0.012 (-0.24, 0.66)	-0.20 / 0.004 (-0.90, 0.50)
pH	-0.92 / 0.000 (-9.29, 7.44)	-5.79 / 0.011 (-18.71, 7.12)
Leucocitos (x10 ⁶ /ml)	-3.93 / 0.015 (-11.66, 3.80)	-9.35 / 0.035 (-21.23, 2.52)

+ IC: intervalo de confianza del 95 %. * p = 0.05. n = 69.

3.3 Evaluación de la RA y su asociación con la fertilidad

Para la evaluación de la RA se consideró el porcentaje de células vivas (negativas a yoduro de propidio) y positivas al anticuerpo CD46 (YP⁻/CD46⁺) (Figura 5) y se determinaron dos tipos de reacción: RAe y RAi. La RAe evalúa a aquellos espermatozoides que pierden el acrosoma durante la preparación de la muestra para el procedimiento FIV, que incluye la separación por gradiente de densidad y la capacitación, por lo cual, un valor de RAe alto se considera un resultado negativo. La RAi considera el porcentaje de células que pierden el acrosoma después de la preparación de la muestra y de la inducción *in vitro* de la reacción con un ionóforo de Ca²⁺ por lo cual, un valor de RAi alto se considera como un resultado positivo, ya que indica la funcionalidad del espermatozoide. Una vez obtenidos los valores de RAe y RAi se obtuvo el ARIC, el cual resulta de la resta de la RAi menos la RAe, cuyo valor

resultante es el porcentaje real de respuesta de una muestra espermática cuando se induce una respuesta similar a lo que ocurre en condiciones fisiológicas (incremento del Ca^{2+} intracelular que dispara la RA).

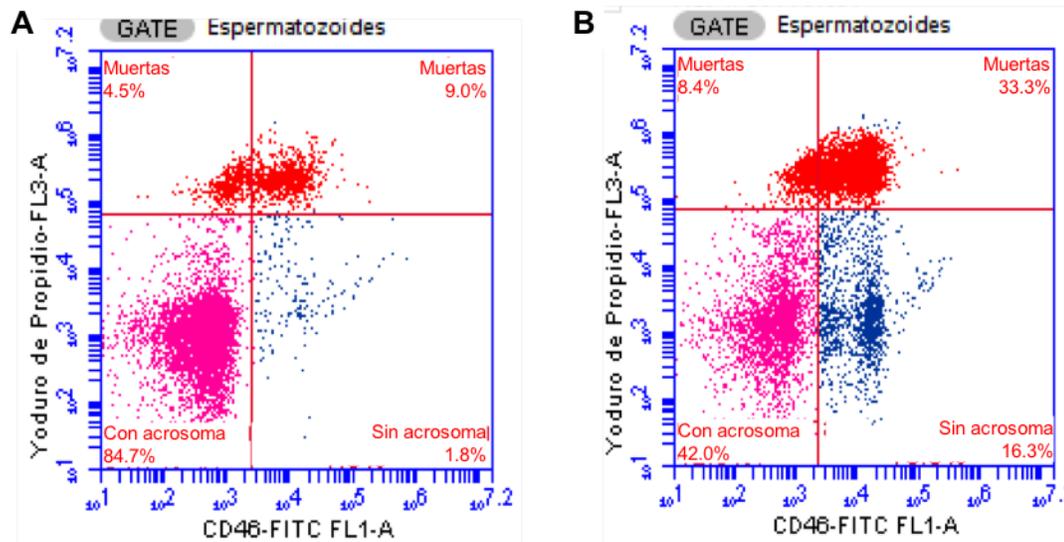


Figura 5. Análisis por citometría de flujo de la RAe y RAi en células espermáticas. Células muertas con o sin acrosoma ($\text{YP}^+/\text{CD46}^-$ o $\text{YP}^+/\text{CD46}^+$, puntos rojos), células vivas con acrosoma ($\text{YP}^-/\text{CD46}^-$, puntos rosas), y las células vivas que perdieron el acrosoma ($\text{YP}^-/\text{CD46}^+$, puntos azules). **A)** Muestra representativa de las células con RAe ($\text{YP}^-/\text{CD46}^-$, azul); **B)** Muestra representativa de las células con RAi después del tratamiento con ionóforo de Ca^{2+} .

Los valores de la media de RAe, RAi y ARIC de los participantes fueron de $3.2 \pm 1.8\%$ para RAe, con un máximo de 9.0% y un mínimo de 0.4% de pérdida espontánea del acrosoma; el RAi tuvo una media de $13.4 \pm 4.2\%$, con un nivel máximo alcanzado de 26.9% de inducción y un mínimo de 0.8%, mientras que el ARIC fue de $10.3 \pm 5.0\%$. Al realizar la asociación lineal simple entre la RA y la tasa de fertilización se observó una asociación significativa en los tres parámetros evaluados para la RA (**Figura 6**): para la RAe se obtuvo una asociación negativa, es decir, por cada unidad de RAe disminuyó 5.9% la tasa de fertilización ($\beta = -5.92$, $r^2 = 0.26$, $p < 0.001$); para la RAi, la asociación fue positiva ($\beta = 1.83$, $r^2 = 0.13$, $p = 0.001$), al igual que para el ARIC ($\beta = 2.10$, $r^2 = 0.25$, $p < 0.001$). Para la asociación entre la RA y el desarrollo de un embrión viable para transferencia, únicamente se encontró una asociación entre la RAe con una disminución de 0.01% en la tasa de blastocistos viables ($\beta = -0.01$, $r^2 = 0.04$, $p = 0.04$) (**Figura 7**), mientras que no hubo asociación con la RAi o el ARIC.

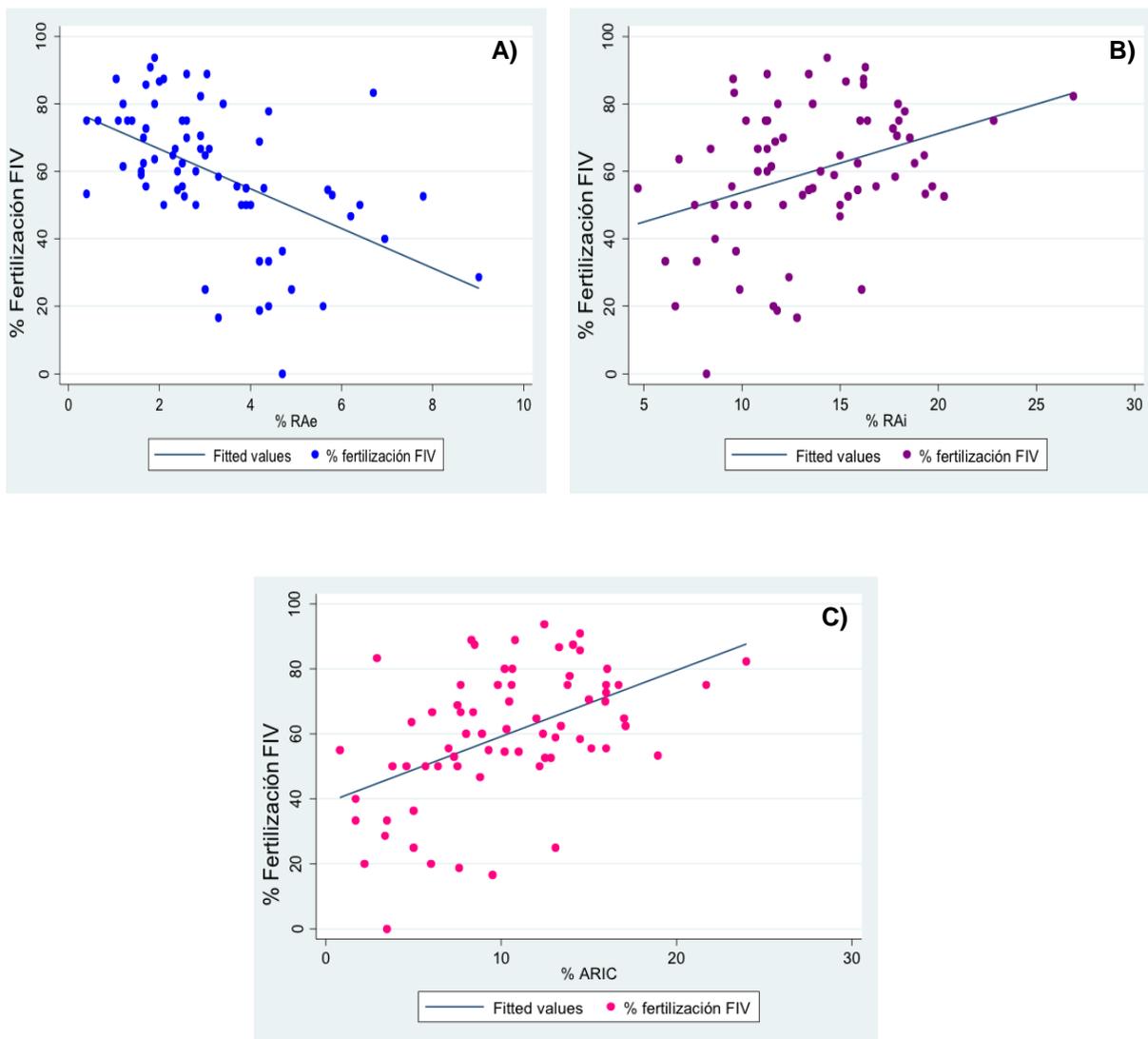


Figura 6. Asociación entre la RA y la tasa de fertilización por FIV. A) Asociación negativa entre la RAe y la fertilización ($\beta = -5.92$, $r^2 = 0.26$, $p < 0.001$). **B)** Asociación positiva entre la RAe y la fertilización ($\beta = 1.83$, $r^2 = 0.13$, $p = 0.001$). **C)** Asociación positiva entre el ARIC y la fertilización ($\beta = 2.10$, $r^2 = 0.25$, $p < 0.001$). $n = 69$

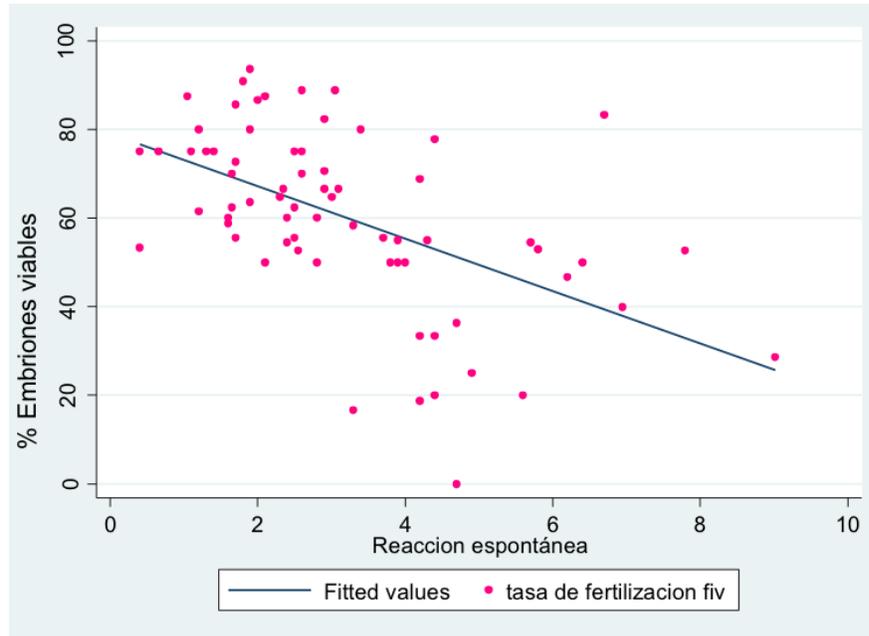


Figura 7. Asociación negativa entre la RAe y el % de blastocistos viables ($\beta = -0.01$, $r^2 = 0.04$, $p = 0.04$), $n = 69$

3.4 Integridad de la cromatina espermática y su asociación con la fertilidad

Para conocer la integridad de la cromatina espermática en los pacientes se utilizó la técnica de SCSA, la cual arroja dos resultados relacionados que incluyen el %DFI que representa la fragmentación del ADN espermático, y el %HDS que indica la condensación de la cromatina.

La media del %DFI obtenido de los participantes fue de $21.8 \pm 6.3\%$, mientras que la media del %HDS fue de $7.1 \pm 3.5\%$. El 33.3% de los pacientes tuvieron un valor de $\%DFI \geq 25$, considerado de pobre capacidad fértil (Evenson, 2013). Basándose en el valor del %DFI, la calidad del ADN espermático se puede clasificar en cuatro categorías: excelente ($\leq 15\%$) con 15.9% de los participantes; buena (>15 a $\leq 25\%$) el 60.9% de los participantes; pobre (> 25 a $\leq 50\%$) con 23.2% de los participantes y, finalmente, la categoría muy mala ($< 50\%$), en la cual no se encontró algún participante. Por otro lado, el valor máximo de %HDS en este estudio fue de 16% y únicamente se observó en un paciente, el valor de referencia es de 25%.

Al realizar el análisis de regresión lineal entre la integridad de la cromatina (%DFI y %HDS) con el porcentaje de blastocistos viables se observó una asociación negativa con el %DFI ($\beta = -1.77$, $r^2 = 0.11$, $p = 0.003$), es decir, se observó una disminución de 1.8% en los blastocistos viables de los participantes (**Figura 8-A**), mientras que no hubo asociación con el %HDS (**Figura 8-B**).

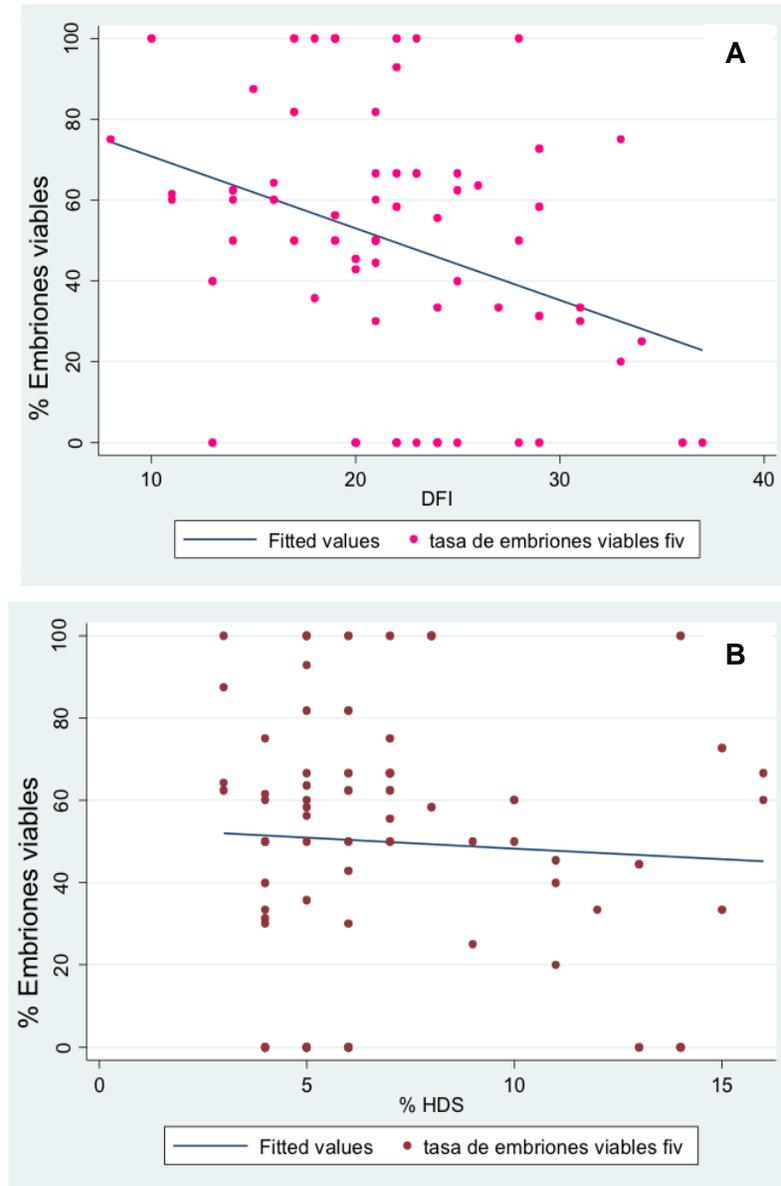


Figura 8. Asociación entre la integridad de la cromatina espermática y el desarrollo de blastocistos viables. A) Asociación negativa entre el %DFI y el % de blastocistos viables ($\beta = -1.77$, $r^2 = 0.11$, $p = 0.003$). **B)** Asociación no significativa entre el %HDS y el % de blastocistos viables ($\beta = -0.52$, $r^2 = 0.01$, $p = 0.62$). $n = 69$

3.5 Niveles de EROS en los espermatozoides

Para establecer los niveles de EROS en los participantes se consideró el valor de la media de fluorescencia de la DCF de las células vivas (negativas a Sitox Red®) (**Figura 9**). Se observó una media de 1389.08 ± 981.80 unidades de fluorescencia en $76.5 \pm 10.8\%$ de las células vivas, con un rango amplio de 289.87 a 5005.07 unidades de fluorescencia.

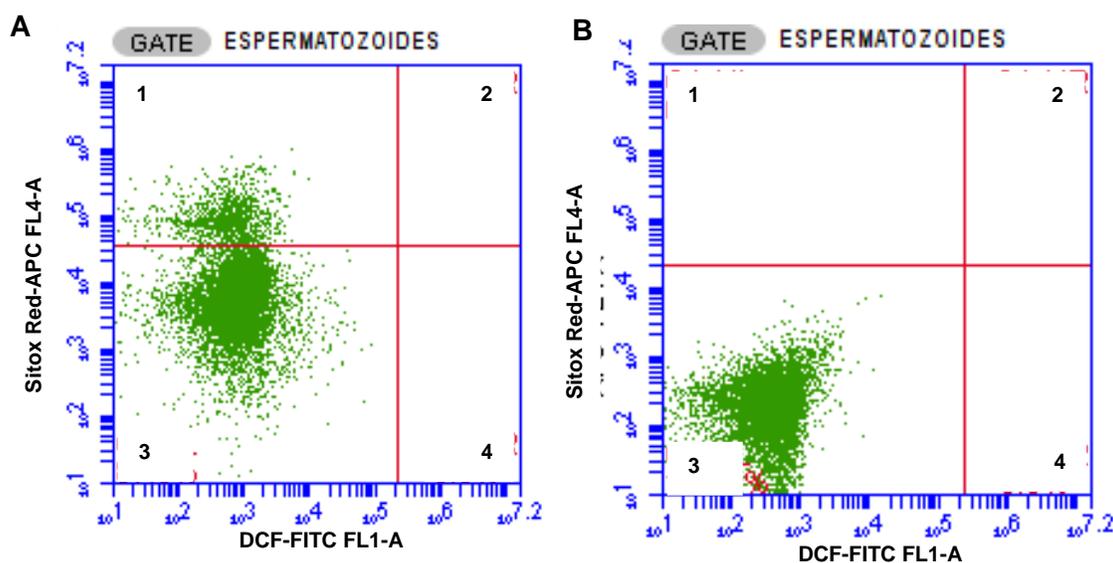


Figura 9. Niveles de estrés oxidante en los espermatozoides de los participantes. A) Células sin marcaje. **B)** Células marcadas con DCF y Sitox Red®. La población de células muertas (Sitox Red®, cuadrante 1) y la población de células vivas (Sitox Red®, cuadrante 3). Todas las células se consideran DCF+. DCF, diclorofluoresceína.

Debido a la importancia de las EROS en el daño a macromoléculas, se realizaron los análisis de asociación con los parámetros de calidad espermática de la OMS y los parámetros de función espermática evaluados en este trabajo (RA e integridad de la cromatina). No se encontró asociación con la mayoría de los parámetros de la OMS, excepto una asociación marginal con la motilidad, en donde por cada unidad de cambio en la fluorescencia disminuyó 0.002% la motilidad espermática. Considerando que las unidades de EROS pueden ser de miles, la disminución en la motilidad puede ser de hasta el 2.0% (**Figura 10**).

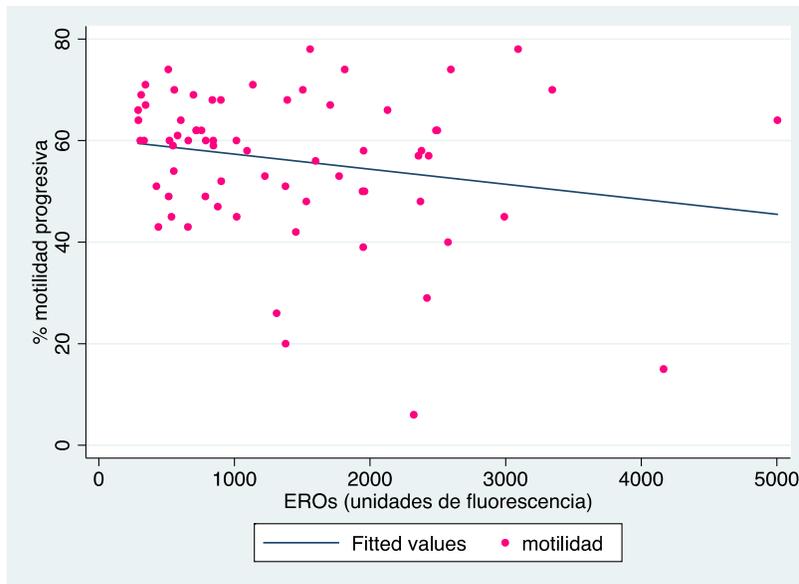


Figura 10. Asociación entre las EROS y la motilidad espermática. ($\beta = -0.002$, $r^2 = 0.02$, $p = 0.09$). $n = 69$

Por otro lado, los niveles de EROS no parecieron afectar significativamente a la RA. Sin embargo, el incremento de EROS se asoció de manera positiva con el incremento en la fragmentación del ADN (%DFI) ($\beta = 0.001$, $r^2 = 0.05$, $p = 0.02$) y con el incremento en la compactación de la cromatina (%HDS) ($\beta = 0.001$, $r^2 = 0.08$, $p = 0.01$) (**Figura 11**).

3.6 Factores ambientales asociados con la alteración en la fertilidad

A través de un cuestionario estructurado que se les aplicó a los participantes se obtuvo información sobre factores de riesgo ambientales, hábitos y enfermedades que pueden alterar la fertilidad (ver la sección 3.1), ya sea porque modifican los parámetros de función espermática evaluados durante este estudio (RA, fragmentación del ADN, EROS) o su asociación con las tasas de fertilización y de blastocistos viables.

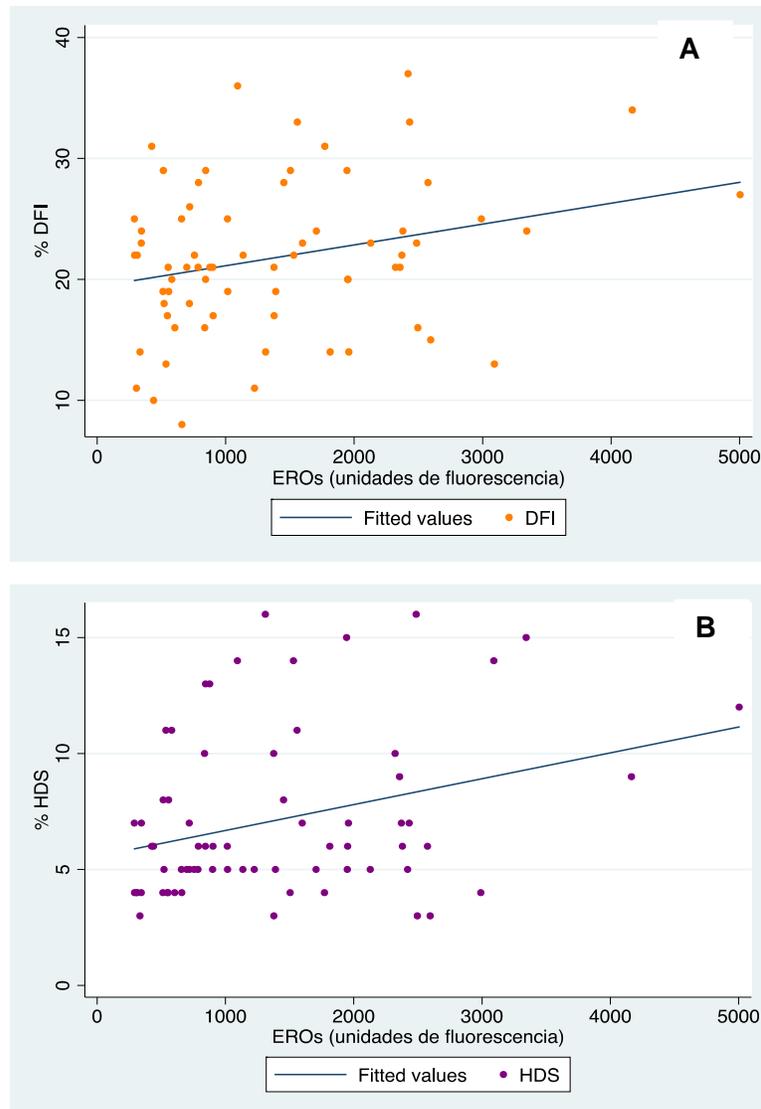


Figura 11. Asociación positiva entre las EROS y la integridad de la cromatina espermática. A) Incremento de %DFI por las EROS ($\beta = 0.001$, $r^2 = 0.05$, $p = 0.02$). **B)** Incremento del % HDS por las EROS ($\beta = 0.001$, $r^2 = 0.08$, $p = 0.01$). $n = 69$

3.6.1 Asociación entre los factores ambientales de riesgo con la fertilización y los blastocistos viables

Se observó una asociación positiva entre la tasa de fertilización con la residencia de los participantes en la ZMVM ($\beta = 11.37$, $r^2 = 0.06$, $p = 0.01$). En cuanto a la asociación entre algunos factores de riesgo ambientales y la tasa de blastocistos viables, se encontró una asociación marginal entre el consumo de antioxidantes y un aumento de

17% en la tasa de blastocistos viables ($\beta = 17$, $r^2 = 0.04$, $p = 0.08$). También se observó una asociación marginal entre el consumo de medicamentos con un incremento de 15.2% en el desarrollo de blastocistos viables ($\beta = 15.2$, $r^2 = 0.04$, $p = 0.07$). No fue posible establecer la asociación con algún medicamento en específico. No se pudo obtener un modelo final para los factores ambientales con la fertilización o viabilidad del embrión, ya que las variables significativas en la regresión lineal simple perdieron significancia al incluirlas en un modelo multivariado.

3.6.2 Asociación entre los factores ambientales de riesgo con los parámetros de función y calidad espermática

Para la RAe, se observó una asociación marginal positiva con la cercanía de la vivienda o trabajo a vialidades altamente transitadas ($p=0.07$, $\beta=0.90$, $r^2=0.04$), así como a herrerías ($\beta = 1.04$, $r^2 = 0.04$, $p = 0.04$). La RAi no se asoció con alguno de los factores evaluados, mientras que el ARIC se asoció negativamente con la cercanía de herrerías ($\beta = -3.20$, $r^2 = 0.06$, $p = 0.03$). También se encontró una asociación marginal entre la cercanía de la vivienda o trabajo de los participantes a herrerías con un incremento en el %DFI de 3.8 ($p = 0.06$, $\beta = 3.8$, $r^2 = 0.04$). No se observó alguna asociación entre el %HDS con los factores ambientales de riesgo. El incremento en las EROS se asoció de manera positiva con la exposición al humo de segunda mano ($\beta = 495.09$, $r^2 = 0.04$, $p = 0.03$) y con la residencia de los participantes en la ZMVM ($\beta = 509.59$, $r^2 = 0.05$, $p = 0.03$), y finalmente con una disminución con el consumo de antioxidantes como la vitamina E ($\beta = -559.90$, $r^2 = 0.06$, $p = 0.01$).

Se probó un modelo multivariado para saber si las asociaciones observadas en el modelo de regresión lineal simple explicaban alguna alteración en la RA o el %DFI, o en el incremento de las EROS, sin embargo, no se obtuvo un modelo que pudiera ajustarse, y las variables que fueron significativas en la regresión lineal perdieron significancia.

3.7 Modelo de predicción de la tasa de fertilización *in vitro*

Se realizó el análisis de regresión lineal multivariada incluyendo en el modelo aquellas variables que resultaron asociadas con la fertilización en los modelos de regresión lineal simple (RAe, RAi, ARIC, morfología buena y el tiempo de residencia en la ZMVM), y algunas variables generales de ajuste como edad, IMC, escolaridad, etc. Se obtuvieron tres modelos de asociación entre los tres tipos de RA y la fertilización ajustados por la morfología espermática; dado que el ARIC es un índice obtenido de la RAe y RAi, en este modelo, éste se consideró como el más representativo de la función espermática (**Tabla 4**).

Tabla 4. Modelo multivariado del éxito en la fertilización *in vitro*.

	Coefficiente beta (IC95%)*	EE	p	r²
ARIC	2.25 (1.45 – 3.05)	0.4012	0.0001	0.34

Modelo ajustado por el porcentaje de morfología espermática evaluada por los criterios de Kruger. *Intervalo de confianza del 95%. EE, error estándar.

Para establecer si la asociación observada con el ARIC podía mantenerse cuando se dividía a la población como éxito/no éxito de fertilización, se desarrolló un modelo logit categorizando a la variable de fertilización en ≥ 60 y $< 60\%$, utilizando las variables ARIC y morfología como variables continuas (**Tabla 5**). Esta categorización se hizo considerando que las tasas de fertilización en la clínica dónde se desarrolló el estudio se consideran buenas cuando se obtiene entre el 50 y 60%.

Una vez que se confirmaron las asociaciones en el modelo logit, se utilizó la función logística del modelo para desarrollar la ecuación final para predecir el éxito individual en la tasa de fertilización. En la ecuación final se utilizan los valores de las betas (β) de la tabla 6 para obtener la probabilidad de un paciente de tener fertilización $\geq 60\%$:

$$\hat{p} = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \dots \beta_n X_n}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \dots \beta_n X_n}}$$

En donde:

β_0 = beta constante del modelo (probabilidad basal si X_1 y X_2 valieran cero) (-4.58)

β_1 = beta correspondiente al ARIC en el modelo (0.24)

β_2 =beta correspondiente a la morfología en el modelo (0.59)

$X_{1,2}$ = Resultado de cada prueba diagnóstica

De esta manera, la ecuación final para conocer la probabilidad de un paciente de tener fertilización $\geq 60\%$, tomando en cuenta la prueba de RA (ARIC) y la morfología espermática quedaría de la siguiente manera (**Ecuación 1**):

$$\hat{p} = \frac{e^{((-4.58)+(0.24)(x_1)+(0.59)(x_2))}}{1 + e^{((-4.58)+(0.24)(x_1)+(0.59)(x_2))}}$$

Ecuación 1. Predicción individual para el éxito en la tasa de fertilización.

Tabla 5. Modelo logit para el éxito en la tasa de fertilización $\geq 60\%$

Fertilización $\geq 60\%$	Coefficiente beta (IC95%)*	EE	p	χ^2
ARIC	0.24 (0.10 – 0.37)	0.06	0.000	0.000
Morfología	0.59 (0.14 – 1.04)	0.23	0.01	
Constante	-4.58 (-7.17 a -1.98)	1.32	0.001	

*Intervalo de confianza del 95%. EE, error estándar.

Posteriormente se realizó el análisis de la curva ROC y para este modelo de predicción (AUC = 0.803, 95%CI: 0.717, 0.888, $p < 0.001$) se calcularon los posibles puntos de corte para determinar cuándo una probabilidad se clasificaría como positiva. Así, se encontró que el corte de 0.65 de probabilidad de clasificar a un paciente como positivo (fertilización $\geq 60\%$) permitió tener una buena sensibilidad (63.1%), especificidad (80.6%), valor predictivo positivo (80%) y valor predictivo negativo (64.1%); es decir, si

la probabilidad de un paciente es ≥ 0.65 (a partir de la ecuación de predicción de la figura 14), su diagnóstico individual es que su fertilización será $\geq 60\%$.

Finalmente se hizo la validación de la fórmula de predicción con nuestra base de datos, calculando para cada paciente la probabilidad de tener una fertilización $\geq 60\%$ utilizando sus respectivos resultados de ARIC y morfología. Se encontró que la predicción de probabilidad coincidió con el resultado de la fertilización FIV en el 74% de los pacientes. Con esto, se puede sugerir que la combinación de la evaluación de la RA y la morfología espermática son herramientas adicionales para predecir el éxito de la fertilización con una especificidad del 80.6%.

3.8 Modelo de predicción para la tasa de blastocistos viables

De manera similar al modelo de fertilización, se desarrolló un modelo de predicción para la tasa de blastocistos viables durante un ciclo de FIV; partiendo de la asociación entre la tasa de blastocistos viables y la fragmentación del ADN (%DFI) se probaron los modelos con otras variables de ajuste como edad, IMC, escolaridad, etc. Sin embargo, no se observaron variables que modificaran la asociación entre la tasa de blastocistos viables y el %DFI, por lo cual, el modelo final se mantuvo como la regresión lineal simple (**Tabla 6**).

A partir del modelo anterior se realizó el modelo logit, utilizando un punto de corte para la variable de blastocistos viables de $\geq 40\%$, este porcentaje se considera alto en clínicas de reproducción asistida para blastocistos que pueden usarse para transferencia; la variable de %DFI se mantuvo continua (**Tabla 7**).

Tabla 6. Modelo de regresión lineal simple para el desarrollo de blastocistos viables.

Blastocistos viables $\geq 40\%$	Coefficiente beta (IC95%)*	EE	p	r^2
% DFI	-1.77 (-2.91 a -0.64)	0.56	0.003	0.11

*Intervalo de confianza del 95%. EE, error estándar.

Tabla 7. Modelo de logit para el desarrollo de blastocistos viables $\geq 40\%$.

Blastocistos viables $\geq 40\%$	Coefficiente beta (IC95%)*	EE	p	χ^2
%DFI	-0.19 (-0.30 a -0.07)	0.05	0.001	0.0001
Constante	5.11 (2.44– 7.7)	1.36	0.000	

*Intervalo de confianza del 95%. EE, error estándar.

Usando la función logística y los valores de las betas (β) del modelo logit para blastocistos viables, se obtuvo la ecuación de predicción individual para tener una probabilidad de tener blastocistos viables $\geq 40\%$:

$$\hat{p} = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \dots \beta_n X_n}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \dots \beta_n X_n}}$$

En dónde:

β_0 = beta constante del modelo (probabilidad basal si X_1 fuera cero) (5.11)

β_1 = beta correspondiente al % DFI en el modelo (-0.19)

X_1 = Resultado de cada prueba diagnóstica

Así, la ecuación final para conocer la probabilidad de un paciente de tener blastocistos viables por FIV $\geq 40\%$ cuando se le emplea el dato de %DFI, quedaría de la siguiente manera (**Ecuación 2**):

$$\hat{p} = \frac{e^{((5.11)+(-0.19)(x_1)}}{1 + e^{((5.11)+(-0.19)(x_1)}}$$

Ecuación 2. Predicción individual para el desarrollo de blastocistos viables.

De manera similar al modelo de predicción de la fertilización, para determinar el punto de corte para clasificar como positiva la probabilidad obtenida de la ecuación, se utilizó la curva ROC (AUC = 0.773, IC95%: 0.673, 0.873, $p < 0.0002$), obteniendo el punto de corte de 0.70 como óptimo, ya que proporcionó una buena sensibilidad (72.3%),

especificidad (68.2%), valor predictivo positivo (VPP = 82.9%), valor predictivo negativo (VPN = 53.6%), falsos positivos (31.8%) y falsos negativos (27.7%), es decir, si el valor de probabilidad de la ecuación es ≥ 0.70 , el pronóstico del paciente es que tendrá $\geq 40\%$ de blastocistos viables.

Posteriormente se realizó la validación de la ecuación de predicción con nuestra base de datos, calculando para cada paciente la probabilidad de tener blastocistos viables $\geq 40\%$, utilizando el resultado de SCSA (%DFI); la predicción de la probabilidad coincidió con el resultado de la tasa de blastocistos viables (tuvo o no más de 40% de blastocistos viables) en el 72.5% de los pacientes. Con lo anterior, podemos sugerir que la incorporación de la técnica de SCSA al procedimiento de evaluación espermática en un laboratorio de andrología contribuye a tener una buena predicción acerca de la capacidad espermática de un individuo para formar blastocistos viables.

3.9 Modelo de predicción en pacientes normospérmicos

Adicionalmente, considerando solamente a los participantes normospérmicos ($n = 46$), se obtuvieron asociaciones similares entre la tasa de fertilización y RAe ($\beta = -7.39$, $p < 0.0001$), RAi ($\beta = 2.30$, $p < 0.0001$) y ARIC ($\beta = 2.57$, $p < 0.0001$); y entre el %DFI y la tasa de blastocistos viables ($\beta = -2.18$, $p < 0.001$). Por otro lado, los modelos de predicción para el ARIC y la tasa de fertilización (**Tabla 8**) y el %DFI con la tasa de blastocistos viables (**Tabla 9**) fueron muy similares a los que incluyeron a todos los pacientes.

Tabla 8. Modelo logit para el éxito en la tasa de fertilización en hombres normospérmicos.

Fertilización $\geq 60\%$	Coefficiente beta (IC95%)*	EE	p	χ^2
ARIC	0.43 (0.18 – 0.68)	0.12	0.001	0.000
Constante	-3.47 (-5.77 a -1.17)	1.17	0.003	

*Intervalo de confianza del 95%. EE, error estándar.

Tabla 9. Modelo logit para el éxito en la tasa de blastocistos viables en hombres normospérmicos.

Blastocistos viables \geq 40%	Coeficiente B	EE	p	χ^2
%DFI	-0.22 (-0.37 a -0.08)	0.07	0.002	0.000
Constante	5.30 (2.09 – 8.51)	1.63	0.001	

*Intervalo de confianza del 95%. EE, error estándar.

4.0 DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad y función espermáticas para desarrollar un perfil de pruebas que permitan predecir el potencial fértil masculino, a través de la tasa de fertilización y de blastocistos viables obtenidos de FIV. Adicional a los parámetros de la OMS, se incluyeron tres parámetros de la función y calidad espermática (integridad de la cromatina, RA y EROS) previamente reportados en la literatura de manera separada, y cuya evaluación pudiera aplicarse simultáneamente para predecir el potencial fértil masculino. Además, para la elección de estos parámetros se consideró el tiempo y el costo de cada análisis, de manera que fuera viable su incorporación en la clínica.

4.1 Características generales de la población de estudio

La edad promedio de los participantes fue de 40.0 ± 6.1 años, con grado académico de licenciatura principalmente (47.8%) y siendo la mayoría residentes de la ZMVM 56.5%. Un porcentaje mínimo de participantes eran fumadores (5.8%) y pocos tenían un diagnóstico de enfermedad (4.3% de hipertensión, 8.7% de varicocele y 7.2% de infección genital). Para el IMC, el 52.2% estuvo por arriba de ≥ 25 y el 36.2% ≥ 30 , lo que indica que la mayoría estaba en sobrepeso u obesidad de acuerdo con la clasificación de la OMS. Según la investigación clínica, en los hombres con sobrepeso u obesidad aumentan los niveles de estrés oxidante, lo que puede disminuir la calidad de los espermatozoides, incluida la concentración, la motilidad y la RA, aumentar el daño en el ADN espermático y disminuir la tasa de implantación embrionaria, comparados con los de los hombres con IMC normal (Dupont et al., 2013; Jensen et al., 2004). En este estudio no se obtuvieron asociaciones entre el IMC y los parámetros anteriores, esto podía deberse a que casi el 90% de los participantes no están en un rango de peso normal, por lo cual no es una variable discriminatoria en esta población. Además, el 56.5% reportó el consumo frecuente de antioxidantes (≥ 3 veces a la semana), lo cual podría ser una atenuante al daño que podría generarse por el estrés oxidante debido a la obesidad.

4.2 Calidad de semen de acuerdo con los parámetros de la OMS y su asociación con la fertilidad

La espermatobioscopía es actualmente la herramienta básica utilizada en todos los laboratorios de andrología para proporcionar información acerca del potencial fértil masculino; ésta se basa en el “Manual de laboratorio de la OMS para el examen y procesamiento del semen humano” que sirve de guía para evaluar la calidad seminal, en el cual se incluye la evaluación de la licuefacción, volumen, color, pH, concentración, motilidad, viabilidad y morfología de los espermatozoides y concentración de leucocitos. En este estudio, la mayoría de los participantes se clasificaron como normospermicos (66.7%), el 26.1% con morfología mala (teratospermia), el 5.8% con motilidad y morfología bajas (astenoteratospermia), y el 1.4% con volumen bajo (hipospermia); sin embargo, este diagnóstico solo refleja aspectos externos de la calidad de semen baja que en la mayoría de los casos no se puede asociar con el potencial fértil masculino.

Varios estudios han demostrado que los parámetros de la OMS no pueden discriminar entre hombres fértiles y aquellos con problemas de fertilidad. Nallella y colaboradores encontraron en un grupo de 91 donantes normales y 166 hombres con problemas de infertilidad, que la motilidad y la concentración espermática no son capaces de determinar el potencial fértil masculino, ya que el 54% de los hombres fértiles tenían motilidad baja, mientras que la concentración era muy similar en ambos grupos (Nallella et al., 2006). De manera similar, en un estudio de 430 parejas de la población general se demostró que niveles altos de volumen, concentración y motilidad no se asociaron con mejores tasas de embarazo (Bonde et al., 1998). En el presente estudio, únicamente se observó una asociación positiva entre la morfología espermática y la tasa de fertilización ($p = 0.05$). Esto concuerda con lo reportado en la literatura, en donde se ha observado que, entre los parámetros de la OMS, la evaluación de la morfología puede ser buen predictor de la fertilidad; Coetzee y colaboradores analizaron 10 artículos, y haciendo un punto de corte mínimo de $\geq 4\%$ de formas normales, este parámetro tuvo valores predictivos positivos de FIV (77.6%) y de embarazo (26%) (Coetzee et al., 1998). Otro estudio con 120 parejas en tratamiento

de FIV reveló que la morfología fue el único predictor significativo de fertilización ($p = 0.0006$, $r^2 = 0.09$), $\geq 4\%$ de formas normales podía predecir 40% de fertilización, la cual incrementaba hasta el 97% con $\geq 12\%$ de formas normales (Vawda et al., 1996). En otros estudios también se demostró que el porcentaje de formas espermáticas normales permite discriminar entre hombres fértiles y subfértiles, sin factor femenino de infertilidad (Guzick et al., 2001; Menkveld et al., 2011; Zinaman et al., 2000). En el presente estudio, la media de formas normales fue de $3.7 \pm 1.5\%$ que junto con el ARIC permitió predecir $\geq 60\%$ de fertilización.

4.3 Reacción acrosomal y su asociación con la fertilidad

La RA es un evento mediado por vías de señalización complejas que incluyen al Ca^{2+} intracelular y otros iones, el aumento en la fluidez de la membrana plasmática asociada con el contenido de colesterol y la formación de complejos de proteínas SNARE, entre otros, que causa la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosómica externa y la liberación de enzimas líticas (Darszon et al., 2005; Tomes et al., 2002). A inicios de los años 90, la RA se comenzó a perfilar como un posible marcador de función espermática en hombres (Henkel et al., 1993; Ohashi et al., 1992; Parinaud et al., 1995) y en estudios en modelos animales (Hossain et al., 2011; Lybaert et al., 2009). En estudios más recientes, el porcentaje de predicción de la fertilización que se alcanza es bajo (30-50%), y depende de la especificidad en la técnica usada para la evaluación de la RA (uso de sondas de fluorescencia específicas vs la morfología acrosomal) (Söderlund y Lundin, 2001; Wiser et al., 2014).

En el presente estudio utilizamos la detección del estado del acrosoma mediante el anticuerpo CD46 por citometría de flujo, este anticuerpo reconoce a la proteína CD46 localizada exclusivamente en la membrana acrosomal interna del espermatozoide, por lo que solo se detecta cuando se ha perdido el contenido acrosomal, lo cual lo hace altamente específico (Carver-Ward et al., 1996a); además, se utilizó la inducción de la RA con el ionóforo de Ca^{2+} A23187, el cual es el más reportado en la literatura. El valor de la media de la RAI del presente estudio fue muy cercano al obtenido por Jaiswal y colaboradores ($13.4 \pm 4.2\%$ vs $11.6 \pm 2.1\%$) en muestras de donantes sanos

normospérmicos, utilizando la misma técnica (Jaiswal et al., 1999). Además en un estudio realizado en 26 hombres subfértiles, los valores de la RAe (7.5 ± 6.12 %), RAI (19.0 ± 11.80 %) y ARIC (11.5 ± 11.53 %) fueron ligeramente mayores (Cummis et al., 1991) a las del presente estudio (3.16 ± 1.78 , 13.42 ± 4.25 y 10.26 ± 4.98 , respectivamente), detectando el estado del acrosoma por la técnica de microscopía FITC-PSA. Esta diferencia puede deberse posiblemente al tiempo de incubación con el medio capacitante (1 h vs 2 h en el presente estudio) y la precisión de la citometría de flujo comparada con la microscopía; se puede considerar que los valores de RA de este estudio se encuentran dentro del rango obtenido en la literatura para espermatozoides humanos.

4.4 Integridad de la cromatina espermática y su asociación con la fertilidad

El daño genético es una de las causas de la infertilidad masculina inexplicable cuando los parámetros de calidad de semen son normales (Oleszczuk et al., 2013). En los participantes de este estudio, la media de la fragmentación del ADN (%DFI) fue de 21.8 ± 6.3 y la media de la compactación de la cromatina (%HDS) fue de 7.1 ± 3.5 evaluados por la técnica de SCSA. Esta técnica está validada para diagnosticar el potencial fértil, con un punto de corte de ≥ 25 para %DFI y %HDS, tanto para un embarazo natural o por inseminación intrauterina (Evenson, 2013). De acuerdo con estos puntos de corte, ninguno de los participantes en este estudio tuvo valores superiores a 25 de %HDS, es decir, no presentaron alteraciones en la compactación de la cromatina, mientras que el 33% de los participantes tuvo un %DFI ≥ 25 , por lo cual serían diagnosticados con calidad espermática pobre y, por lo tanto, potencial fértil bajo, lo que se vio reflejado en una tasa de blastocistos viables menor del 42% en este subgrupo. En este trabajo observamos una asociación negativa entre el parámetro de %DFI y la tasa de blastocistos viables, mientras que no hubo asociación con la fertilización; esto era de esperarse, ya que un espermatozoide con daño genético es capaz de fertilizar al óvulo y formar los dos pronúcleos, sin embargo, el daño puede manifestarse hasta la formación del blastocisto y arrestar su desarrollo, comprometiendo la viabilidad del embrión, o generar un embarazo fallido (Borini et al., 2006; Henkel et al., 2003; Tesarik et al., 2002).

La evaluación de la fragmentación del ADN espermático y su asociación con la fertilidad, principalmente en ART, es uno de los parámetros de calidad espermática más estudiados, y se ha asociado principalmente con una disminución de la calidad o viabilidad embrionaria (Benchaib et al., 2003; Simon et al., 2010; Virro et al., 2004), falla en la implantación (Boe-Hansen et al., 2006; Frydman et al., 2008) y falla en el embarazo (Garolla et al., 2015; Kennedy et al., 2011; Spanò et al., 2000). Sin embargo, su aplicación como predictor del potencial fértil masculino en un resultado personalizado no se había reportado hasta ahora; como se discutirá más adelante, la asociación entre el %DFI y la tasa de blastocistos viables encontrada en este estudio nos permitió desarrollar una predicción individualizada para la tasa de blastocistos viables.

El daño genético en espermatozoides humanos se genera principalmente por estrés oxidante durante la espermatogénesis, maduración epididimal y durante el transporte en el líquido seminal, causando la generación de bases oxidadas como la 8-OHdG y rupturas de cadena del ADN, debido a la baja capacidad de reparación que tiene el espermatozoide (Badouard et al., 2008; Jeng et al., 2015). Además, la exposición a la radiación o agentes tóxicos genera daño en el ADN, lo que induce la expresión de proteínas como p53 que son sensores celulares que activan las proteínas pro-apoptóticas (Aitken et al., 2013)

4.5 Niveles de EROS en los espermatozoides

Las EROS tienen un papel crucial en varios pasos reproductivos: en el desarrollo normal y la maduración de los espermatozoides, la capacitación, la RA y la fertilización, por lo que son una de las principales causas de los problemas de fertilidad masculina. Las fuentes endógenas de EROS incluyen la presencia de leucocitos y espermatozoides inmaduros en el semen y la actividad mitocondrial en los espermatozoides. Las fuentes exógenas incluyen: reacciones inflamatorias y enfermedades del tracto genital masculino (Ford, 2004), así como diversos hábitos nocivos o negativos y contaminantes ambientales. En este estudio, los niveles de

EROS se determinaron por la fluorescencia de la DCF, la cual es sensible principalmente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y se encontraron asociaciones entre los niveles de EROS con la motilidad ($p = 0.009$) y fragmentación del ADN espermáticos. La asociación negativa con la motilidad espermática se ha observado en varios estudios, como el de Agarwal y colaboradores en hombres con problemas de fertilidad ($n = 318$) en quienes se encontró una correlación negativa entre la producción de EROS y el porcentaje de espermatozoides motiles ($r = -0.265$; $p < 0.001$) (Agarwal et al., 2014). Otro estudio evaluó los niveles de daño oxidante en los espermatozoides en 40 hombres con problemas de fertilidad, encontrando correlaciones negativas entre la motilidad y niveles de lipoperóxidos ($r = -0.823$, $p < 0.0001$) y la presencia del aducto 8-OHdG ($r = -0.703$, $p < 0.0001$) (Kao et al., 2008), ambos tipos de daño son consecuencia de altos niveles de EROS.

En el presente estudio, los niveles de EROS también se asociaron con el incremento en la fragmentación del ADN (%DFI, $p = 0.02$). Un estudio realizado *in vitro* con espermatozoides expuestos a agentes oxidantes ($12.5-200 \mu M$ de H_2O_2 y $1.25-20 mM$ de NADPH), la producción de EROS se asoció con un aumento dependiente de la dosis en la ruptura del ADN ($p < 0.001$), evaluado por el ensayo cometa; mientras que en un ensayo de fertilización con ovocitos de hámster chino disminuyó la capacidad de fusión (Aitken et al., 1998). Otro hallazgo en el presente estudio fue la asociación entre las EROS y una mayor compactación de la cromatina espermática (%HDS, $p = 0.01$), sin embargo, ninguno de los participantes rebasó el límite máximo de 25%.

Consideramos que las asociaciones observadas con las EROS pueden sugerir una participación en la alteración de los parámetros de función y calidad espermáticas, sin embargo, las EROS no se asociaron directamente con los eventos de fertilización o blastocistos viables, por lo cual no resultaron significativos para obtener el modelo para las ecuaciones de predicción.

4.6 Factores ambientales asociados con la alteración en la fertilidad

En relación con los factores ambientales de riesgo, se encontraron pocas asociaciones con la fertilidad masculina, y la mayoría fueron asociaciones con significancia marginal, la cual se perdió en los modelos multivariados y en el modelo de predicción final; únicamente la tasa de fertilización se asoció positivamente con la residencia dentro de la ZMVM ($p = 0.01$), lo cual no se puede considerar plausible desde el punto de vista de la exposición a contaminantes ambientales en esta zona, o calidad de vida.

Las asociaciones más relevantes se observaron entre la cercanía de la vivienda o trabajo del participante a herrerías y la RA (RAe, $p = 0.04$; ARIC, $p = 0.03$) y el %DFI ($p = 0.06$); estos establecimientos generan emisiones contaminantes a la atmósfera, dentro de ellos se incluyen a los metales pesados, conocidos por tener un alto potencial oxidante (Aitken et al., 2014). Como se mencionó en la sección anterior, el incremento en el %DFI se asoció con las EROS, por lo cual podríamos proponer que las herrerías son una de las fuentes relevantes de emisión de contaminantes que incrementaron las EROS, sin embargo, es necesario diseñar un estudio para probar esta hipótesis.

Por otra parte, la exposición al humo del cigarro se asoció con las EROS ($p = 0.03$); esta asociación se ha observado que afecta la calidad espermática, altera la membrana de los espermatozoides y disminuye los niveles de actividad antioxidante en el líquido seminal (Pasqualotto et al., 2008; Saleh et al., 2002), además de dañar al ADN que en el presente estudio también se observó asociado con las EROS ($p = 0.02$). Adicionalmente, el consumo de antioxidantes se asoció con una disminución en las EROS ($p = 0.01$), lo cual está bien reportado, el uso de suplementos orales antioxidantes y la adición de antioxidantes en el medio de preparación de los espermatozoides como la vitamina E, vitamina C, N-acetil-l-cisteína, carnitina, selenio, etc. en ART mejora la fertilidad masculina (Lombardo et al., 2011). En el presente estudio no se pudo definir cuáles antioxidantes consumían los participantes.

4.7 Modelo de predicción para la tasa de fertilización *in vitro*

Para obtener la ecuación de predicción individual de la fertilización se realizó el análisis de regresión logística, incluyendo en el modelo las variables predictoras de morfología y el ARIC, y se utilizó como punto de corte $\geq 60\%$ de fertilización. La elección de la dicotomización en 60% se basó en la media de la tasa de fertilización observada en este estudio ($60.3 \pm 20.2\%$) y las tasas de fertilización que son consideradas exitosas en tratamientos de reproducción asistida. Además, utilizando esta dicotomización y el punto de corte en la curva ROC de 0.65 para clasificar como positivo ($\geq 60\%$) o negativo ($< 60\%$) el resultado de la ecuación de predicción, se pudo obtener la mejor sensibilidad y especificidad para el modelo. En un meta-análisis reciente de 15 artículos sobre el uso de la RA como predictor de la fertilidad, se incluyeron los datos de 1033 parejas infértiles bajo FIV y se encontró que la RAi correlacionaba con la tasa de fertilización ($\beta = 0.40$, CI95%: 0.24–0.57, $p < 0.001$). Posteriormente, para obtener el valor predictivo de la RA en la fertilización, los datos se estratificaron dependiendo de la preparación de la muestra (espermatozoides criopreservados, frescos, separación en gradiente o *swim-up*), el tipo de inductor de la RA (manosa, ZP, ionóforo de Ca^{2+}) y la técnica de detección (inmunofluorescencia o microscopía óptica), sin embargo, el desempeño diagnóstico era muy variable, encontrando que el principal inconveniente fue no lograr una buena sensibilidad y especificidad al mismo tiempo (Xu et al., 2018).

En este estudio, la inclusión de ARIC y la morfología espermática nos permitió obtener una predicción de fertilización individual para el paciente de al menos 60%, con una buena sensibilidad y especificidad (63.2 y 80.6 %, respectivamente). En otros estudios empleando la RA solo se pudo predecir de 30 a 50% de fertilización (Calvo et al., 1994; Carver-Ward et al., 1996b; Söderlund y Lundin, 2001; Wisner et al., 2014), por lo que nuestra ecuación de predicción es más completa, ya que tiene buena sensibilidad y especificidad y predice una fertilización mayor a los modelos publicados. Si nuestra ecuación se aplica de manera rutinaria a cada paciente se podría predecir, al menos en el 80.6% de los casos (especificidad del modelo), que la muestra espermática inducirá una fertilización $\geq 60\%$. En caso contrario, se podría sugerir un tratamiento

para mejorar la fertilización del gameto masculino, como el cambio de hábitos y el consumo de suplementos alimenticios, o un tratamiento de fertilidad, como FIV o incluso ICSI que ha mostrado tasas de fertilización mayores (Johnson et al., 2013; Morozumi y Yanagimachi, 2005), o sugerir la donación de gametos masculinos en aquellos hombres que no tengan un pronóstico positivo en la predicción.

La RA puede alterarse por diversos factores, internos y externos; por ejemplo, se sabe que el plomo causa una RA prematura (Benoff et al., 2003) y una RAi disminuida, este metal altera la homeostasis del Ca^{2+} , provoca daño en el ADN y estrés oxidante alterando múltiples eventos de la RA, incluyendo una regulación negativa de la actividad de la acrosina, disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular y concentración elevada de calmodulina (Li et al., 2017). La obesidad es otro factor que deteriora la RA, debido a la alteración de los niveles circulantes de estradiol y la respuesta baja a la progesterona, ambos inductores de la RA (Samavat et al., 2014). En el presente estudio, casi el 90% de los participantes tenían obesidad o sobrepeso, lo que no permitió que fuera una variable distintiva en la población y no se observó una asociación con la RA. En la mayoría de los casos, el factor determinante para una función acrosomal defectuosa es el estrés oxidante proveniente de múltiples fuentes, que resulta en alteraciones moleculares como la carbonilación de proteínas y la lipoperoxidación, por lo tanto, en el daño a la membrana celular de los espermatozoides o proteínas implicadas en las vías que regulan la exocitosis acrosomal (Abou-haila y Tulsiani, 2009; Aitken et al., 2014).

4.8 Modelo de predicción para la tasa de blastocistos viables

En el presente estudio se observó una asociación entre el %DFI y la tasa de blastocistos viables, lo cual se utilizó para el modelo de predicción; el punto de corte para el análisis de regresión logística se estableció en $\geq 40\%$ para obtener blastocistos viables, esto con base en la experiencia de un laboratorio de reproducción asistida en el que obtener un 40% de blastocistos viables se considera clínicamente aceptable. Nuestro modelo de predicción tuvo una buena sensibilidad (72.3%) y especificidad (68.2%), utilizando el punto de corte de 0.7 en la curva ROC para clasificar como

positivo el resultado de la ecuación predictiva. Como previamente se discutió (ver sección 4.4), los reportes del uso del %DFI para pronosticar la calidad espermática se basan en clasificar a un paciente con $\%DFI \geq 25$ como de potencial fértil bajo y se asocia con baja tasa de embarazo natural o por ART (Evenson, 2013). Sin embargo, su utilidad como un parámetro que puede dar una predicción personalizada no se ha reportado.

La ventaja de utilizar nuestra ecuación de predicción utilizando el %DFI es que permite conocer individualmente la probabilidad de éxito o fracaso en la obtención de blastocistos viables de un hombre, por lo tanto, disminuye la probabilidad de fallo en el desarrollo embrionario y permite ampliar el perfil de diagnóstico del potencial fértil masculino. Adicionalmente, la ventaja del análisis con la técnica de SCSA es que se puede realizar anticipadamente con poca variación entre muestras (Evenson, 2013), lo que permite conocer la calidad de una muestra espermática para un embarazo natural o un tratamiento de reproducción asistida, así como decidir sobre el tratamiento clínico para mejorar la calidad del ADN del paciente en función de evitar los factores externos que pudieran influir en el daño genético.

4.9 Modelo de predicción en pacientes normospérmicos

Está reportado en la literatura la falta de eficacia en los parámetros de la OMS para diagnosticar los problemas de fertilidad y se estima que 40-50% de los casos de infertilidad masculina se caracterizan como "idiopáticos" (Cooper et al., 2010; Hamada et al., 2011), por lo tanto, se realizaron modelos de predicción únicamente con los pacientes normospérmicos para conocer si nuestros modelos de predicción eran útiles en este subgrupo de participantes. Los resultados fueron muy similares a los obtenidos con todos los participantes, tanto para el modelo de fertilización como para el de blastocistos viables, lo que indica que estos modelos permiten hacer un mejor diagnóstico en este subgrupo de pacientes, basándose en la calidad y función espermáticas.

4.10 Limitaciones del estudio

Dentro de las limitaciones de este estudio se pueden considerar las siguientes: i) la validación de las ecuaciones de predicción se realizó retrospectivamente empleando la base de datos del estudio, obteniendo un 73.9% y 72.5% de coincidencia con el resultado de la tasa de fertilización y de blastocistos viables, respectivamente; por lo tanto, es necesario realizar la validación en otras poblaciones. ii) Un número reducido de participantes, incrementando el tamaño de la muestra podría aumentar la sensibilidad y especificidad de la predicción. Adicionalmente, iii) sería óptimo conocer la variación de la evaluación de la RA y %DFI en muestras de un mismo participante para saber la validez con respecto al tiempo de la predicción sobre el potencial fértil.

5. CONCLUSIONES

1. La RA, principalmente el ARIC se asoció con la tasa de fertilización, mientras que el %DFI y la morfología se asociaron con la tasa de blastocistos viables.
2. La presencia de EROS se asoció significativamente con la fragmentación del ADN (%DFI).
3. Ninguna variable ambiental de riesgo oxidante se asoció con la fertilización o la viabilidad de los blastocistos.
4. Se logró proponer ecuaciones predictivas del potencial fértil masculino de forma personalizada, incorporando la determinación de la RA (ARIC) y la fragmentación del ADN (%DFI) al análisis de la calidad del espermatozoide, adicional a la evaluación de la morfología espermática.
5. Las asociaciones observadas entre la RA y la tasa de fertilización y entre el %DFI y la tasa de blastocistos viables se mantuvieron en los modelos con pacientes considerados normospérmicos, lo que sugiere que estos parámetros son herramientas que pueden predecir exitosamente la fertilidad masculina de manera individual, incluso en pacientes con infertilidad inexplicable.
6. La predicción individual del potencial fértil facilitará la toma de decisiones con respecto al abordaje del problema de fertilidad masculina, lo cual disminuiría los costos y el tiempo de tratamiento en las parejas, y será una herramienta en investigación para valorar los riesgos potenciales para la fertilidad masculina.

6. PERSPECTIVAS

- Realizar la validación de las ecuaciones predictivas en otras poblaciones y antes del procedimiento de FIV, así corroborar la efectividad de la predicción.
- Una vez validadas las ecuaciones, evaluar la variación de las predicciones de un mismo paciente en muestras espermáticas de diferentes días, lo que permitirá saber el periodo de validez de una predicción.
- Incorporar el uso de estas evaluaciones y nuestros modelos de predicción de manera rutinaria en los Laboratorios de Andrología, ya sea para lograr un embarazo natural, por FIV o para uso en investigación.

7. REFERENCIAS

- Abou-Haila, A., Tulsiani, D.R., 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 173–82.
- Abou-haila, A., Tulsiani, D.R.P., 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 485, 72–81.
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., Chyatte, M.R., 2015. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13.
- Agarwal, A., Sharma, R.K., Sharma, R., Assidi, M., Abuzenadah, A.M., Alshahrani, S., Durairajanayagam, D., Sabanegh, E., 2014. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 33.
- Aitken, R.J., Bronson, R., Smith, T.B., De Iuliis, G.N., 2013. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 475–85.
- Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., 2010. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 3–13.
- Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., McLachlan, R.I., 2009. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.* 32, 46–56.
- Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z., Irvine, D.S., 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59, 1037–1046.
- Aitken, R.J., Jones, K.T., Robertson, S. a, 2012. Reactive oxygen species and sperm function- in sickness and in health. *J. Androl.* 33, 1096–106.
- Aitken, R.J., Nixon, B., 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 785–93.
- Aitken, R.J., Smith, T.B., Jobling, M.S., Baker, M. a, De Iuliis, G.N., 2014. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J. Androl.* 16, 31–8.
- Arrotéia, K.F., Garcia, P.V., Barbieri, M.F., 2011. The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility.
- Badouard, C., Ménézo, Y., Panteix, G., Ravanat, J.L., Douki, T., Cadet, J., Favier, A., 2008. Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote* 16, 9–13.
- Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., Guérin, J.F., 2003. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.* 18, 1023–8.
- Benoff, S., Centola, G.M., Millan, C., Napolitano, B., Marmar, J.L., Hurley, I.R., 2003. Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF. *Hum. Reprod.* 18, 374–383.
- Bi, Y., Xu, W.-M., Wong, H.Y., Zhu, H., Zhou, Z.-M., Chan, H.C., Sha, J.-H., 2009. NYD-SP27, a novel intrinsic decapacitation factor in sperm. *Asian J. Androl.* 11, 229–239.
- Boe-Hansen, G.B., Fedder, J., Ersbøll, A.K., Christensen, P., 2006. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 21, 1576–1582.
- Bonde, J.P., Ernst, E., Jensen, T.K., Hjollund, N.H., Kolstad, H., Henriksen, T.B., Scheike, T., Giwercman, A., Olsen, J., Skakkebaek, N.E., 1998. Relation between semen quality and

- fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 352, 1172–7.
- Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M.A., Fava, L., Flamigni, C., Coticchio, G., 2006. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.* 21, 2876–2881.
- Braude, P., Rowell, P., 2003. Assisted conception. II--in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection. *BMJ* 327, 852–5.
- Bungum, M., Bungum, L., Giwercman, A., 2011. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J. Androl.* 13, 69–75.
- Bungum, M., Humaidan, P., Spano, M., Jepson, K., Bungum, L., Giwercman, A., 2004. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum. Reprod.* 19, 1401–8.
- Calvo, L., Dennison-Lagos, L., Banks, S.M., Dorfmann, A., Thorsell, L.P., Bustillo, M., Schulman, J.D., Sherins, R.J., 1994. Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 9, 1880–6.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E., 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305, 609–13.
- Carver-Ward, J. a, Jaroudi, K. a, Hollanders, J.M., Einspenner, M., 1996a. High fertilization prediction by flow cytometric analysis of the CD46 antigen on the inner acrosomal membrane of spermatozoa. *Hum. Reprod.* 11, 1923–8.
- Carver-Ward, J. a, Jaroudi, K. a, Hollanders, J.M., Einspenner, M., 1996b. High fertilization prediction by flow cytometric analysis of the CD46 antigen on the inner acrosomal membrane of spermatozoa. *Hum. Reprod.* 11, 1923–1928.
- Carver-Ward, J. a, Moran-Verbeek, I.M., Hollanders, J.M., 1997. Comparative flow cytometric analysis of the human sperm acrosome reaction using CD46 antibody and lectins. *J. Assist. Reprod. Genet.* 14, 111–119.
- Cheng, C.Y., 2008. Molecular mechanism in spermatogenesis. Landes Bioscience, Austin, Texas.
- Coetzee, K., Kruge, T., Lombard, C., 1998. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum. Reprod. Update* 4, 73–82.
- Cooper, T.G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W.G., Behre, H.M., Haugen, T.B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M.T., Vogelsong, K.M., 2010. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum. Reprod. Update* 16, 231–45.
- Cornwall, G. a, 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update* 15, 213–27.
- Cummis, J., Pember, S., Jequier, A., Yovich, J., Hartmann, P., 1991. A Test of the Human Sperm Acrosome Reaction Following Ionophore Challenge. *Journal* 12.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C.L., Felix, R., Beltrán, C., 2005. Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int. Rev. Cytol.* 243, 79–172.
- Dupont, C., Faure, C., Sermondade, N., Boubaya, M., Eustache, F., Clément, P., Briot, P., Berthaut, I., Levy, V., Cedrin-Durnerin, I., Benzacken, B., Chavatte-Palmer, P., Levy, R., 2013. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J. Androl.* 15, 622–5.
- Erberelli, R.F., Salgado, R.M., Pereira, D.H.M., Wolff, P., 2017. Hyaluronan-binding system for

- sperm selection enhances pregnancy rates in ICSI cycles associated with male factor infertility. *JBRA Assist. Reprod.* 21.
- Evenson, D., Wixon, R., 2006. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod. Biomed. Online* 12, 466–472.
- Evenson, D.P., 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 14, 1039–1049.
- Evenson, D.P., 2013. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). In: Carrell, D.T., Aston, K.I. (Eds.), *Spermatogenesis: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 147–164.
- Ford, W.C.L., 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update* 10, 387–99.
- Frydman, N., Prisant, N., Hesters, L., Frydman, R., Tachdjian, G., Cohen-Bacrie, P., Fanchin, R., 2008. Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil. Steril.* 89, 92–97.
- Gadella, B.M., 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 229–36.
- Garolla, A., Cosci, I., Bertoldo, A., Sartini, B., Boudjema, E., Foresta, C., 2015. DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome. *Reprod. Biomed. Online* 31, 100–107.
- Gharagozloo, P., Aitken, R.J., 2011. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum. Reprod.* 26, 1628–40.
- Guzick, D.S., Overstreet, J.W., Factor-Litvak, P., Brazil, C.K., Nakajima, S.T., Coutifaris, C., Carson, S.A., Cisneros, P., Steinkampf, M.P., Hill, J.A., Xu, D., Vogel, D.L., 2001. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N. Engl. J. Med.* 345, 1388–1393.
- Hamada, A., Esteves, S.C., Agarwal, A., 2011. Unexplained male infertility. *Hum. Androl.* 1, 2–16.
- Henkel, R., Kierspel, E., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Schill, W.-B., Kruger, T.F., 2003. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod. Biomed. Online* 7, 477–484.
- Henkel, R., Müller, C., Miska, W., Gips, H., Schill, W.B., 1993. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 8, 2128–32.
- Hollingsworth, B., Harris, A., Mortimer, D., 2007. The cost effectiveness of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 571–7.
- Holstein, A.-F., Schulze, W., Davidoff, M., 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 107.
- Hossain, S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A.P., Rodriguez-martinez, H., 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J. Androl.* 13, 406–419.
- Iammarrone, E., Balet, R., Lower, A., Gillott, C., Grudzinskas, J., 2003. Male infertility. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 17, 211–229.
- Ickowicz, D., Finkelstein, M., Breitbart, H., 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J. Androl.* 14, 816–21.

- Irvine, S., Cawood, E., Richardson, D., Macdonald, E., Aitken, J., Iii, M.W.I., 1996. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* 312, 467–471.
- Jaiswal, B.S., Eisenbach, M., Tur-Kaspa, I., 1999. Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Mol. Hum. Reprod.* 5, 214–219.
- Jeng, H.A., Pan, C.-H., Chao, M.-R., Lin, W.-Y., 2015. Sperm DNA oxidative damage and DNA adducts. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 794, 75–82.
- Jensen, T., Anersson, A., Jorgensen, N., Andersen, A., Carlsen, E., Petersen, J., Skakkebak, N., 2004. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil. Steril.* 82, 863–870.
- Johnson, L.N.C., Sasson, I.E., Sammel, M.D., Dokras, A., 2013. Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* 100, 704–11.
- Jurewicz, J., Hanke, W., Radwan, M., Bonde, J.P., 2009. Environmental factors and semen quality. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 22, 305–29.
- Kao, S.-H., Chao, H.-T., Chen, H.-W., Hwang, T.I.S., Liao, T.-L., Wei, Y.-H., 2008. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil. Steril.* 89, 1183–90.
- Kaupp, U.B., Kashikar, N.D., Weyand, I., 2008. Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 93–117.
- Kennedy, C., Ahlering, P., Rodriguez, H., Levy, S., Sutovsky, P., 2011. Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* 22, 272–276.
- Larson-Cook, K.L., Brannian, J.D., Hansen, K. a, Kasperson, K.M., Aamold, E.T., Evenson, D.P., 2003. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil. Steril.* 80, 895–902.
- Larson, K.L., DeJonge, C.J., Barnes, a M., Jost, L.K., Evenson, D.P., 2000. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum. Reprod.* 15, 1717–22.
- Lewis, S.E.M., 2007. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* 134, 31–40.
- Lewis, S.E.M., Aitken, R.J., 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 322, 33–41.
- Lewis, S.E.M., John Aitken, R., Conner, S.J., Iulius, G. De, Evenson, D.P., Henkel, R., Giwercman, A., Gharagozloo, P., 2013. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod. Biomed. Online* 27, 325–37.
- Li, N., Xu, P., Jing, W., Hwang, J.-S., Wang, L., 2017. Toxic effects of Pb²⁺ entering sperm through Ca²⁺ channels in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Aquat. Toxicol.* 192, 24–29.
- Lin, M.H., Lee, R.K.K., Hwu, Y.M., Lu, C.H., Chu, S.L., Chen, Y.J., Chang, W.C., Li, S.H., 2008. SPINKL, a Kazal-type serine protease inhibitor-like protein purified from mouse seminal vesicle fluid, is able to inhibit sperm capacitation. *Reproduction* 136, 559–571.

- Lombardo, F., Sansone, A., Romanelli, F., Paoli, D., Gandini, L., Lenzi, A., 2011. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. *Asian J. Androl.* 13, 690–7.
- Lybaert, P., Danguy, A., Leleux, F., Meuris, S., Lebrun, P., 2009. Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histol. Histopathol.* 24, 999–1007.
- Menkveld, R., Holleboom, C. a G., Rhemrev, J.P.T., 2011. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J. Androl.* 13, 59–68.
- Merchant, R., Gandhi, G., Allahbadia, G.N., 2011. In vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection for male infertility. *Indian J. Urol.* 27, 121–32.
- Merino, G., Lira, S.C., Martínez-Chéquer, J.C., 1998. Effects of cigarette smoking on semen characteristics of a population in Mexico. *Arch. Androl.* 41, 11–5.
- Morozumi, K., Yanagimachi, R., 2005. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 14209–14.
- Nallella, K.P., Sharma, R.K., Aziz, N., Agarwal, A., 2006. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil. Steril.* 85, 629–634.
- Nixon, B., Aitken, R.J., McLaughlin, E. a, 2007. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1805–23.
- Nixon, B., MacIntyre, D. a, Mitchell, L. a, Gibbs, G.M., O'Bryan, M., Aitken, R.J., 2006. The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biol. Reprod.* 74, 275–287.
- Ohashi, K., Saji, F., Kato, M., Okabe, M., Mimura, T., Tanizawa, O., 1992. Evaluation of acrosomal status using MH61-beads test and its clinical application. *Fertil. Steril.* 58, 803–8.
- Okabe, M., 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* 140, 4471–9.
- Oleszczuk, K., Augustinsson, L., Bayat, N., Giwercman, A., Bungum, M., 2013. Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples. *Andrology* 1, 357–60.
- Parinaud, J., Vieitez, G., Moutaffian, H., Richoilley, G., Labal, B., 1995. Variations in spontaneous and induced acrosome reaction: correlations with semen parameters and in-vitro fertilization results. *Hum. Reprod.* 10, 2085–9.
- Pasqualotto, F.F., Umezu, F.M., Salvador, M., Borges, E., Sobreiro, B.P., Pasqualotto, E.B., 2008. Effect of cigarette smoking on antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.* 90, 278–283.
- Patrat, C., Serres, C., Jouannet, P., 2000. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Cell* 92, 255–66.
- Piña-Guzmán, B., Solís-Heredia, M.J., Rojas-García, a E., Urióstegui-Acosta, M., Quintanilla-Vega, B., 2006. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 216–24.
- Reid, A.T., Redgrove, K., Aitken, R.J., Nixon, B., 2011. Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J. Androl.* 13, 88–96.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K., Nelson, D.R., Thomas, A.J., 2002. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil.*

Steril. 78, 491–499.

- Samavat, J., Natali, I., Degl'Innocenti, S., Filimberti, E., Cantini, G., Di Franco, A., Danza, G., Seghieri, G., Lucchese, M., Baldi, E., Forti, G., Luconi, M., 2014. Acrosome reaction is impaired in spermatozoa of obese men: a preliminary study. *Fertil. Steril.* 102, 1274–1281.e2.
- Sharma, R.K., Sabanegh, E., Mahfouz, R., Gupta, S., Thiyagarajan, A., Agarwal, A., 2010. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 76, 1380–6.
- Sharpe, R.M., 1995. On the importance of being earnest. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *Hum. Exp. Toxicol.* 14, 463–4.
- Shen, H.-M., Chia, S.-E., Ni, Z.-Y., New, A.-L., Lee, B.-L., Ong, C.-N., 1997. Detection of oxidative dna damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod. Toxicol.* 11, 675–680.
- Simon, L., Brunborg, G., Stevenson, M., Lutton, D., McManus, J., Lewis, S.E.M., 2010. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum. Reprod.* 25, 1594–1608.
- Simon, L., Lutton, D., McManus, J., Lewis, S.E.M., 2011. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil. Steril.* 95, 652–7.
- Söderlund, B., Lundin, K., 2001. Acrosome index is not an absolute predictor of the outcome following conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18, 483–9.
- Sofikitis, N., Miyagawa, I., Dimitriadis, D., Zavos, P., Sikka, S., Hellstrom, W., 1995. Effects of Smoking on Testicular Function, Semen Quality and Sperm Fertilizing Capacity. *J. Urol.* 154, 1030–1034.
- Sokol, R.Z., Kraft, P., Fowler, I.M., Mamet, R., Kim, E., Berhane, K.T., 2006. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ. Health Perspect.* 114, 360–5.
- Spanò, M., Bonde, J.P., Hjøllund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E., Leter, G., 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil. Steril.* 73, 43–50.
- Stimpfel, M., Verdenik, I., Zorn, B., Virant-Klun, I., 2018. Magnetic-activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa improves the quality of embryos according to female age: a prospective sibling oocyte study. *J. Assist. Reprod. Genet.*
- Suleiman, S., Elamin, M., Zaki, Z., El-malik, E., Nasr, A., 1996. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of Vitamin E. *J. Androl.* 31, 530–537.
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., Frenette, G., 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells. Mol. Dis.* 35, 1–10.
- Svingen, T., Koopman, P., 2013. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 27, 2409–26.
- Tardif, S., Cormier, N., 2011. Role of zonadhesin during sperm-egg interaction: a species-specific acrosomal molecule with multiple functions. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 661–8.
- Tateno, H., Krapf, D., Hino, T., Sanchez-Cardenas, C., Darszon, A., Yanagimachi, R., Visconti, P.E., 2013. Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 18543–18548.

- Tesarik, J., Mendoza, C., Greco, E., 2002. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum. Reprod.* 17, 184–9.
- Tomes, C.N., Michaut, M., De Blas, G., Visconti, P., Matti, U., Mayorga, L.S., 2002. SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* 243, 326–38.
- Vawda, a I., Gunby, J., Younglai, E. V, 1996. Semen parameters as predictors of in-vitro fertilization: the importance of strict criteria sperm morphology. *Hum. Reprod.* 11, 1445–1450.
- Virro, M.R., Larson-Cook, K.L., Evenson, D.P., 2004. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil. Steril.* 81, 1289–95.
- Walls, M., Junk, S., Ryan, J.P., Hart, R., 2012. IVF versus ICSI for the fertilization of in-vitro matured human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 25, 603–607.
- Wassarman, P.M., Jovine, L., Litscher, E.S., 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nat. Cell Biol.* 3, E59-64.
- WHO, 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization, Geneva.
- Wiser, a., Sachar, S., Ghetler, Y., Shulman, A., Breitbart, H., 2014. Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection: Preliminary results. *Andrologia* 46, 313–315.
- Wistuba, J., Stukenborg, J., Luetjens, J., 2007. Mammalian Spermatogenesis. *Glob. Sci. Books.*
- Xu, F., Guo, G., Zhu, W., Fan, L., 2018. Human sperm acrosome function assays are predictive of fertilization rate in vitro: a retrospective cohort study and meta- analysis.
- Zanetti, B.F., Braga, D.P.A.F., Provenza, R.R., Figueira, R.C.S., Iaconelli, A., Borges, E., 2018. Sperm morphological normality under high magnification is correlated to male infertility and predicts embryo development. *Andrology* 6, 420–427.
- Zhao, L., Burkin, H.R., Shi, X., Li, L., Reim, K., Miller, D.J., 2007. Complexin I is required for mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 309, 236–44.
- Zhou, N., Cui, Z., Yang, S., Han, X., Chen, G., Zhou, Z., Zhai, C., Ma, M., Li, L., Cai, M., Li, Y., Ao, L., Shu, W., Liu, J., Cao, J., 2014. Air pollution and decreased semen quality: a comparative study of Chongqing urban and rural areas. *Environ. Pollut.* 187, 145–52.
- Zinaman, M.J., Brown, C.C., Selevan, S.G., Clegg, E.D., 2000. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J. Androl.* 21, 145–53.
- Zini, A., Boman, J.M., Belzile, E., Ciampi, A., 2008. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 23, 2663–8.

Anexo 1: Carta de aprobación del estudio del comité de ética de Ingenes

Resolución y recomendaciones del Comité de Bioética Ingenes correspondientes a la solicitud realizada en Mayo de 2014.

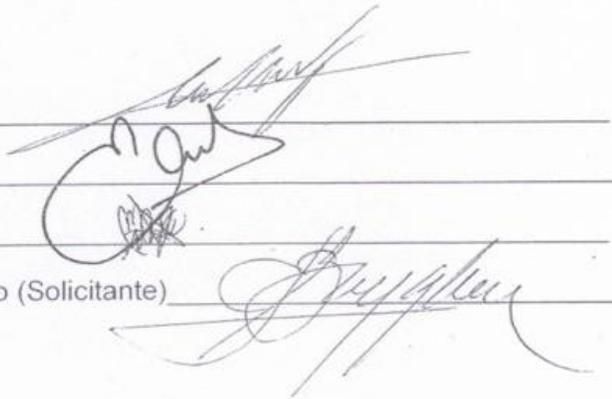
En base a la solicitud realizada en Mayo de 2014 por la Dra. Esther López-Bayghen, el comité de bioética ha resuelto aprobar el proyecto de investigación "Identificación de marcadores proteicos de calidad espermática implicados en el proceso de fertilización en hombres sometidos a técnicas de reproducción asistida" la cual se llevara a cabo por la M en C Mayra Pamela Tello Mora, bajo la dirección científica de la Dra. Esther López-Bayghen Patiño y la Dra. María Betzabet Quintanilla Vega al considerar que no se comprometen los principios de ética en la investigación para los sujetos participantes del estudio al tratarse muestras biológicas donadas altruistamente previa autorización y firma de un consentimiento informado.

Carlos G. Briones (Presidente) _____

Enrique Rodríguez (Vocal) _____

Mariafernanda Zermeño (Vocal) _____

Dra. Esther López-Bayghen Patiño (Solicitante) _____

The image shows four handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The signatures are: 1. Carlos G. Briones (President), 2. Enrique Rodríguez (Vocal), 3. Mariafernanda Zermeño (Vocal), and 4. Dra. Esther López-Bayghen Patiño (Solicitante). The signatures are written in a cursive style.

Anexo 2: Productos generados de este trabajo

Participaciones en congresos:

1. Tello-Mora, Pamela, L. Hernández-Cadena, López-Bayghen. E., B. Quintanilla-Vega. Acrosome reaction and sperm DNA fragmentation as predictors of male fertility and the relationship with environmental factors. XIV International Congress of Toxicology 2016, Merida, Yuc, Mexico. Toxicology Letters, p. S234.
2. Lopez-Bayghen, E., P. Tello-Mora, B. Quintanilla-Vega. Biomarkers for sperm quality are associated with fertility rates and embryo viability. American Society for Reproductive Medicine 2016. Salt Lake City, USA. p. 529.

Artículo:

Tello-Mora P., Hernández-Cadena L., Pedraza J., López-Bayghen E., Quintanilla-Vega B. 2018. Acrosome reaction and chromatin integrity as additional parameters of semen analysis to predict fertilization and blastocyst rates. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16:102.