

**Estudio de nuevos biomarcadores  
moleculares para la mejora de la selección  
espermática en técnicas de reproducción  
asistida**

**Natalia Huerta Retamal**







**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**En colaboración con:**

IVF SPAIN ALICANTE S.L., iGLS, IVF SPAIN FOUNDATION

**ESTUDIO DE NUEVOS BIOMARCADORES MOLECULARES PARA LA  
MEJORA DE LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA EN TÉCNICAS DE  
REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

**NATALIA HUERTA RETAMAL**

**Tesis presentada para aspirar al grado de DOCTORA POR  
LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE**

**MENCIÓN DE DOCTORADO INDUSTRIAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS EXPERIMENTALES Y  
BIOSANITARIAS**

**Dirigida por:**

**DRA. MARÍA JOSÉ GÓMEZ TORRES**



“No puedo saber dónde terminará el viaje, pero sé por dónde  
empezar”

Avicii

“Tengo la voluntad de experimentar, me gusta. Estoy dispuesta a  
probar cosas, mover, ajustar y jugar”

Helena Bonham Carter



## **AGRADECIMIENTOS**

Equipo de investigación

Departamento

Madrid

IVF-Igls

A mi familia (Fernando, Pascual)

Gordos

Multitec



# ÍNDICE

---



## ÍNDICE

	<b>Página</b>
I. Sección Inicial	14
1 Introducción general	16
1.1 Fecundación e infertilidad.	16
1.2 Espermatogénesis y espermiogénesis	19
1.3 Biología celular del espermatozoide	27
1.3.1 Estructura espermática	27
1.3.2 La membrana plasmática	28
1.4 Bases fisiológicas de la fecundación	31
1.4.1 Capacitación espermática	31
1.4.2 Efecto de las células del cúmulo y de la ZP	37
1.4.3 Reacción acrosómica	38
1.5 Capacitación e inducción de la reacción acrosómica <i>in vitro</i>	44
1.5.1 Gradientes de densidad y <i>swim-up</i>	44
1.5.2 Inducción y valoración de la reacción acrosómica	47
1.5.3 Marcadores moleculares	48
1.6 El ratón como modelo experimental	54
1.7 <b>Expresión génica e infertilidad</b>	56
2 Justificación de la unidad temática	60
3 Hipótesis y Objetivos	68
4 Resumen global de los resultados obtenidos	72
4.1 Análisis seminal	72
4.2 Evaluación de la reacción acrosómica espontánea	72
4.3 Fosforilación de tirosinas	73

4.4	Fase 1: distribución de la proteína de choque térmico A2 (hspa2)	73
4.4.1	Caracterización de patrones de distribución de HSPA2 en espermatozoides humanos	73
4.4.2	Correlación entre biomarcadores	75
4.5	Fase 2: Inmunolocalización de Arilsulfatasa A (ARSA)	75
4.5.1	Localización de ARSA en espermatozoides humanos mediante microscopía de fluorescencia	75
4.5.2	Correlación entre biomarcadores	77
4.5.3	Localización de ARSA en espermatozoides humanos mediante FESEM	78
5	Discusión global	80
5.1	Fase 1: distribución de la proteína de choque térmico A2 (hspa2)	81
5.2	Fase 2: Inmunolocalización de Arilsulfatasa A (ARSA)	83
II.	Trabajos publicados o aceptados	88
1	Trabajos publicados. Fase I	90
1.1	Capítulo 1: Distribución de la chaperona HSPA2 en espermatozoides humanos durante la capacitación <i>in vitro</i>	90
2	Trabajos publicados. Fase II	92
2.1	Capítulo 1: Localización de Arilsulfatasa A durante la incubación <i>in vitro</i> de espermatozoides humanos en medio de capacitación.	92
2.2	Capítulo 2: Localización de Arilsulfatasa A mediante Microscopía electronica de transmisión de campo de alta (FESEM) en espermatozoides humanos.	94
III.	Otros trabajos	96
1	El ratón como modelo experimental	98
1.1	Introducción	98

1.2	Material y métodos	98
1.3	Resultados	98
1.3.1	Evaluación de la reacción acrosómica espontánea	98
1.3.2	Fosforilación de tirosinas	100
1.3.3	Caracterización de patrones de distribución de HSPA2 en espermatozoides de ratón	100
1.3.4	Correlación entre biomarcadores	102
1.4	Discusión	102
2	Genes de referencia (HK) para muestras espermáticas	103
2.1	Introducción	103
2.2	Material y métodos	104
2.3	Resultados	104
2.3.1	Análisis seminal	104
2.3.2	Genes de referencia (HK) para muestras seminales	104
2.4	Discusión	104
IV.	Conclusiones	106



## I. SECCIÓN INICIAL

---



## 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

---

### 1.1 FECUNDACIÓN E INFERTILIDAD.

El proceso de fusión de dos células germinales haploides para formar un cigoto diploide se llama fecundación (Yanagimachi, 1994, 1984). Este es un proceso biológico altamente complejo que requiere la integridad funcional y estructural de los gametos femenino y masculino para lograr el embarazo.

La incapacidad de lograr el embarazo tras haber mantenido relaciones sexuales regulares y sin protección durante al menos un año se considera infertilidad (Mittal et al., 2017; World Health Organization, 2010), una enfermedad que actualmente afecta aproximadamente al 15% de las parejas en edad reproductiva (Dawson and Whitfield, 1996; Howards, 1995; Kolesnikova et al., 2015).

Las causas de la infertilidad son muy variadas, desde la edad de la mujer hasta una calidad seminal deficiente, pero es el factor masculino el que afecta a aproximadamente el 50% de los casos (Vander Borcht and Wyns, 2018). Si nos centramos únicamente en los casos de infertilidad masculina, ésta puede estar producida por varias causas, entre las cuales se encuentran los trastornos genéticos, factores ambientales (Choy and Eisenberg, 2018; Wong et al., 2003), fallos en la espermatogénesis, patologías (Huidobro, 2010; Irvine, 2000) o

estilo de vida (Martini et al., 2004; Vander Borgh and Wyns, 2018).

El estudio de estas causas de infertilidad ha permitido desarrollar tratamientos o técnicas de reproducción asistida (TRA) más efectivas y personalizadas, incrementado su uso en los últimos años (Huidobro, 2010; Jensen et al., 2002; Nyboe Andersen and Erb, 2006). De entre las TRA más extendidas, la inyección intracitoplasmica de espermatozoides (ICSI; del inglés *Intracytoplasmic Sperm Injection*), introducida hace más de 20 años (Palermo et al., 1992), es una de las técnicas más ampliamente utilizada en los ciclos de reproducción asistida actualmente



(Beck-Fruchter, Shalev, & Weiss, 2016); esta técnica ofrece un nuevo enfoque en el tratamiento de la esterilidad cuando existe factor masculino severo. Sin embargo, está lejos de ser una solución ideal ya que actualmente la selección de espermatozoides se basa en el juicio de un embriólogo, que selecciona los espermatozoides en base a criterios morfológicos. Así, los espermatozoides seleccionados para la ICSI pueden contener DNA (del inglés *desoxiribonucleic acid*) fragmentado o deficiencias cromosómicas lo que puede llevar a un aumento

del riesgo de pérdida del embarazo



(Celik-Ozenci et al., 2004),





(Parmegiani et al., 2010).

Esto unido al insatisfactorio porcentaje de éxito de estas técnicas (Torabi et al., 2017; Vaughan et al., 2019) ha derivado en un incremento de los estudios a nivel celular y molecular de las causas subyacentes a la infertilidad masculina. El análisis seminal previo al uso de una TRA se basa en la valoración de los parámetros que establece la última edición del manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el manual para el

examen y procesamiento de muestras de semen humano (World Health Organization, 2010).

En este manual se establecen no solo los parámetros microscópicos y macroscópicos a tener en cuenta, sino que también se fijan unos límites de referencia por debajo de los cuales se considera que la muestra analizada presenta algún tipo de patología.

Con la estandarización del análisis seminal se pretendió evitar la subjetividad, así como facilitar la recomendación de una TRA adecuada dependiendo de la patología existente. Sin embargo, la heterogeneidad de las muestras y la variabilidad intra- e interindividual entorpecen la obtención de resultados fiables sobre las causas de la infertilidad masculina únicamente con los parámetros evaluados en un seminograma (Auger et al., 2000; Ostermeier et al., 2018). Además, estos parámetros han demostrado ser insuficientes dada la existencia de la infertilidad idiopática, es decir, dados los casos de varones infértiles que presentan parámetros seminales normales.

Debido a la imposibilidad de identificar defectos moleculares en el espermatozoide mediante un seminograma convencional, resulta necesaria la complementación del análisis seminal con el examen de otros atributos espermáticos que son críticos en la fecundación. De esta forma será posible hacer un diagnóstico fiable más temprano, ayudando al paciente a reducir el costo

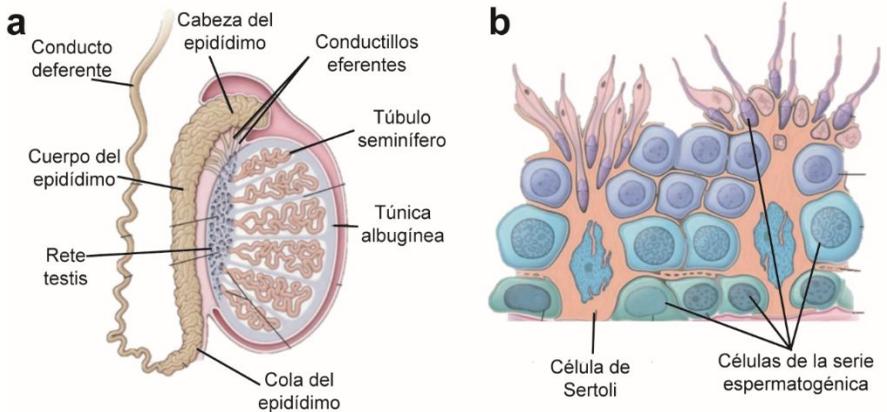
emocional y el riesgo de exponerlo a tratamientos que no son necesarios, creando de esta manera una mejor terapia individualizada (De Jonge, 2012).

## 1.2 ESPERMATOGÉNESIS Y ESPERMIOGÉNESIS

Para entender e interpretar la infertilidad masculina, es necesario conocer en profundidad del gameto masculino. Se trata de una célula haploide especializada que consta de una serie de características funcionales y estructurales que adquiere durante su formación, diferenciación y maduración y que le permiten transportar el genoma masculino al gameto femenino. La formación y maduración de los espermatozoides ocurre en el tracto genital masculino formado por los testículos, las vías espermáticas, las glándulas sexuales accesorias y los genitales externos. Las glándulas sexuales accesorias que complementan este sistema incluyen las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales.

Es en los testículos donde comienza la espermatogénesis (producción de espermatozoides) y la esteroidogénesis (síntesis de andrógenos) (Ross and Pawlina, 2016). Cada testículo, en su cara interna, se compone de unos 250 lobulillos y cada uno de los lobulillos está compuesto por 1-4 túbulos seminíferos. Estos túbulos se encuentran revestidos por el epitelio seminífero, un epitelio estratificado compuesto por células de Sertoli y células

de la serie espermatogénica organizadas en capas no definidas (**Figura 1**).



**Figura 1:** Diagrama esquemático de un corte sagital del testículo humano (**a**) y del epitelio seminífero humano (**b**) (modificado de Ross and Pawlina, 2016).

El proceso de espermatogénesis comienza antes de la pubertad bajo la influencia de las altas concentraciones de gonadotropinas hipofisarias y continúa durante toda la vida. Se trata de un proceso dividido en tres fases (Ross and Pawlina, 2016) (**Figura 2**):

**-Fase espermatogónica:** La célula madre espermatogónica se divide mediante mitosis. Esta división permite a la célula reemplazarse a sí misma a la vez que produce una población de espermatogonios que se dividen según su función:

-*Tipo A oscuros*: permanecerán como células madre de reserva.

-*Tipo A claros*: continuarán con el proceso de diferenciación

-*Tipo B*: último espermatogonio de la fase espermatogónica que, mediante división mitótica, dará lugar al espermatozoides primario.

-**Fase espermatozoica**: el espermatozoides primario duplica su DNA. De esta manera, cada una de estas células tiene la cantidad normal de cromosomas, pero el doble de cantidad de DNA. Esto es debido a que, tras dos divisiones meióticas, el espermatozoides primario pasará primero por una fase de espermatozoides secundario para finalmente dar lugar a las células haploides con una sola cromátide llamadas espermátidas.

- **Fase de espermátida (espermioogénesis)**: las espermátidas, todavía inmóviles y sin la estructura característica del espermatozoides, se diferencian en espermatozoides maduros a través de cuatro fases diferenciadas (Elder and Dale, 2011):

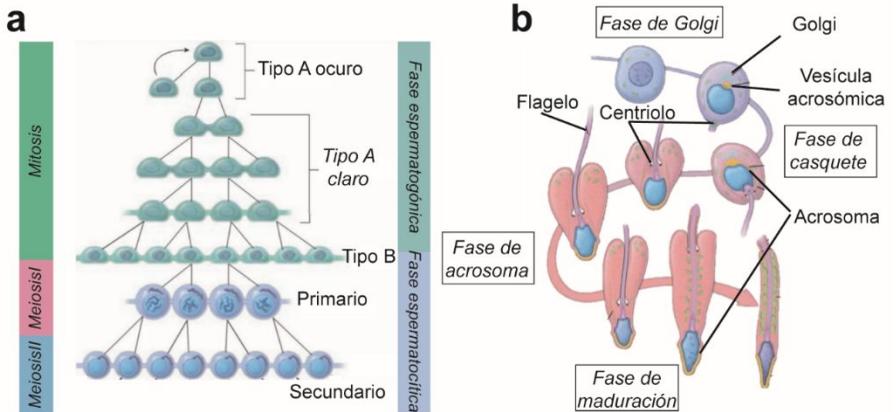
-*Fase de Golgi*: Diferenciación del polo anterior del espermatozoides provocado por el inicio de la formación del acrosoma a partir de gránulos proacrosómicos provenientes del aparato de Golgi. Migración de los centriolos hacia el polo posterior del espermatozoides.

-*Fase de casquete*: Formación del capuchón acrosómico o acrosoma por la extensión de la bolsa acrosómica sobre los

dos tercios anteriores del núcleo. Engrosamiento de la porción de la envoltura nuclear que contacta con el acrosoma. Superenrollamiento del DNA por la sustitución de la mayoría de las histonas por protaminas.

*-Fase de acrosoma:* Reorientación de la espermátide hasta dejar la cabeza clavada en la célula de Sertoli y la cola apuntando hacia la luz del túbulo seminífero. Aplanamiento y alargamiento del núcleo. Modificación de los centriolos para formar la pieza de conexión o cuello. Migración de mitocondrias hasta la región del cuello donde se dispondrán en modo de vaina helicoidal y formación del flagelo.

*-Fase de maduración:* Reducción del exceso de citoplasma y liberación de la célula hacia la luz de los túbulos seminíferos (Ross and Pawlina, 2016).

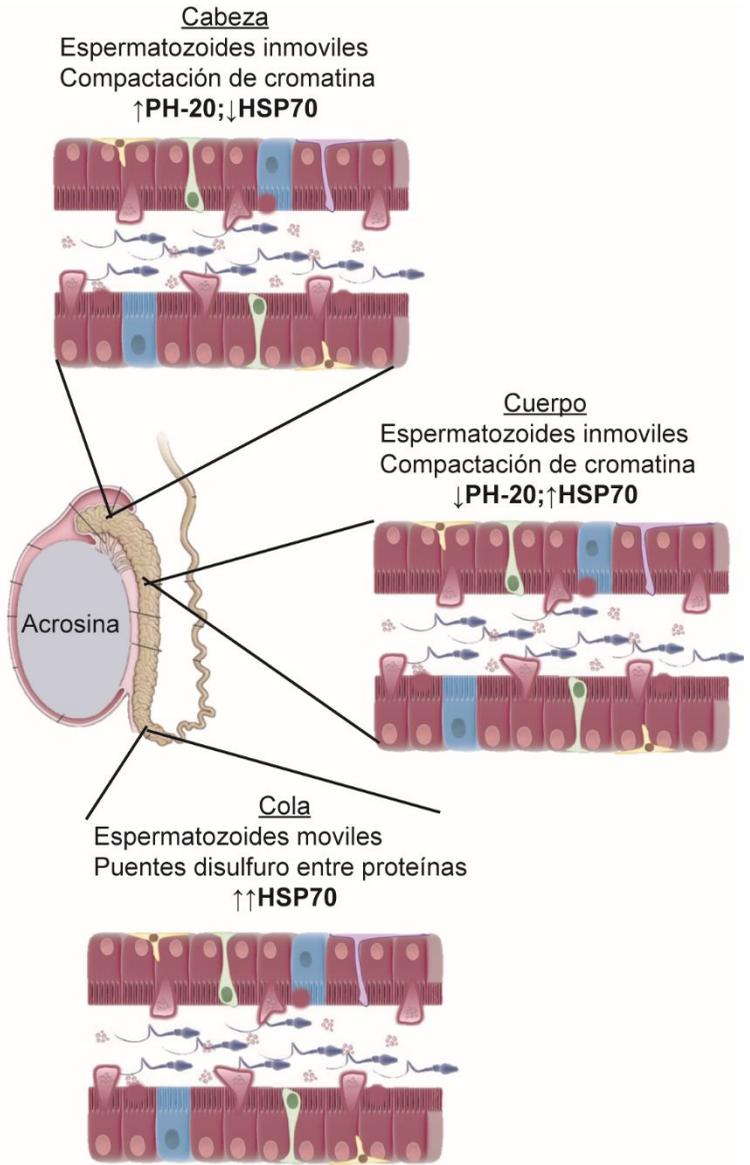


**Figura 2:** Representación de los cambios que acontecen durante la espermatogénesis (a) y espermiogénesis (b) (modificado de Ross and Pawlina, 2016)

Tras la espermiogénesis en los túbulos seminíferos, los espermatozoides son maduros a nivel morfológico, pero aun necesitan un proceso de maduración que tendrá lugar a lo largo del epidídimo (**Figura 3**). El cambio más evidente durante la maduración epididimaria es la adquisición de potencial de movimiento del flagelo, pero además de este importante cambio, en epidídimo los espermatozoides también adquieren la capacidad de reconocer, unirse y penetrar en el ovocito (Grudzinskas and Yovich, 2004).

Estas modificaciones funcionales van acompañadas de numerosas modificaciones fisiológicas y bioquímicas causadas por moléculas segregadas por el epitelio del epidídimo (Dacheux et al., 2012; Grudzinskas and Yovich, 2004). De esta

manera ocurre, por ejemplo, la alteración en la composición lipídica de las membranas espermáticas, el secuestro de enzimas redundantes a lo largo del flagelo, la estabilización estructural de las fibras densas del flagelo con enlaces disulfuro (De Jonge y Barratt, 2017; Grudzinskas y Yovich, 2004) y la estabilización de la cromatina espermática.



**Figura 3:** Efecto de la maduración epididimaria en la célula espermática (adaptado de Ross and Pawlina, 2016; Zhou et al., 2018)

Por otra parte, durante las etapas finales de la maduración epididimaria se producen modificaciones secuenciales discretas en la superficie de los espermatozoides, que adquieren receptores específicos para la zona pelúcida (ZP) en la membrana plasmática (Grudzinskas and Yovich, 2004). Un pequeño ejemplo de las proteínas que adquiere el espermatozoide a través de su paso por el epidídimo y que están implicadas en su unión a la ZP puede verse en la **Tabla 1**.

**Tabla 1:** Proteínas epididimarias implicadas en la unión espermatozoide-ZP, entre otras (para más detalle consultar De Jonge and Barratt, 2017)

	Localización en el epidídimo				Localización en el espermatozoide			Papel durante la fecundación
	T	Ca	Cu	Co	E	Ca <sub>p</sub>	RA	
<b>PH20 (SPAM1)</b>	mRNA				C	C	MAI	Unión 2º a ZP
<b>PH20 (SPAM1)</b>	mRNA	mRNA/P	mRNA/P		C			Hialuronidasas
<b>HSP70</b>		mRNA/P	mRNA/P	mRNA/P				Desconocida

### ARSA

**C:** cabeza del espermatozoide; **Ca:** Cabeza del epidídimo; **Cap:** Espermatozoides capacitados; **Co:** Cola del epidídimo; **Cu:** Cuerpo del epidídimo; **E:** Espermatozoides eyaculados; **MAI:** Membrana

acrosomal interna; **mRNA**: se encuentra su mRNA; **P**: se encuentra la proteína formada; **RA**: Espermatozoides reaccionados; **T**: Testículo.

### 1.3 **BIOLOGÍA CELULAR DEL ESPERMATOZOIDE**

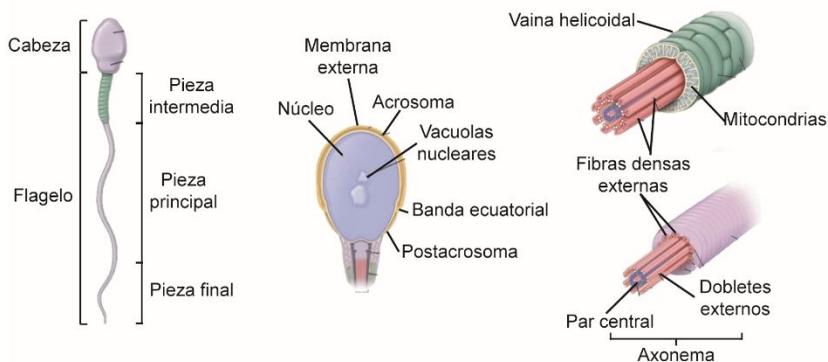
#### 1.3.1 **Estructura espermática**

Una vez formada la célula espermática, a nivel morfológico, se pueden diferenciar dos estructuras: la cabeza y el flagelo (**Figura 4**).

La cabeza del espermatozoide contiene una cantidad muy reducida de citoplasma y es donde se localiza el núcleo alargado. Como se ha mencionado anteriormente, en el núcleo espermático el DNA se encuentra supercondensado debido a la sustitución de las histonas por protaminas (Rathke et al., 2014; Sutovsky and Manandhar, 2006). En la parte más apical de la cabeza espermática, se puede encontrar una estructura en forma de bolsa denominada acrosoma. Esta estructura formada, a partir del aparato de Golgi durante la espermiogénesis, contiene enzimas que son necesarias para que el espermatozoide pueda atravesar las células del cúmulo y la ZP y llegar a la superficie del ovocito (Gadella and Luna, 2014).

Por su parte, el flagelo está formado por la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza final. La migración de mitocondrias hasta la región del cuello durante la espermiogénesis desencadena la formación del flagelo, ya que estas mitocondrias

se disponen en modo de vaina helicoidal rodeando nueve fibras densas y dando lugar a la pieza intermedia (Toshimori and Eddy, 2015). La capacidad de esta estructura de proporcionar la fuerza motriz necesaria para el movimiento del espermatozoide es debida a la estructura del axonema interno formado por nueve pares de microtúbulos externos y dos centrales, asociados a



todos ellos brazos de dineína encargados de producir el movimiento del flagelo. La pieza principal por su parte está constituida por siete fibras densas externas rodeando al axonema y las columnas longitudinales de la vaina fibrosa, que es una estructura de soporte del flagelo que también aporta energía necesaria para la motilidad de este. Por último, la pieza final sólo está formada por el axonema y la membrana plasmática (Lehti and Sironen, 2017).

**Figura 4:** Esquema de la estructura de un espermatozoide maduro y de sus componentes principales (modificado de Ross and Pawlina, 2016)

### **1.3.2 La membrana plasmática**

La membrana plasmática es una estructura que contiene grupos de lípidos, proteínas y glicoconjugados organizados en la clásica estructura de bicapa. La interacción y el reconocimiento célula-célula que se produce entre el espermatozoide y el ovocito, está mediado por moléculas presentes en las membranas plasmáticas de ambos gametos (Friend, 1982).

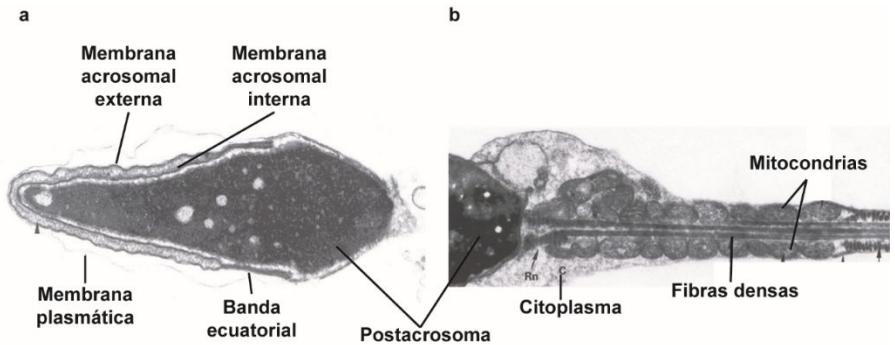
Las proteínas que conforman la membrana plasmática en el espermatozoide realizan diversas funciones relacionadas con la fusión de gametos, como el transporte de moléculas específicas al interior y exterior de la célula, o bien actúan como enzimas o catalizadores. Se pueden encontrar proteínas periféricas (o glicoproteínas) unidas por uniones no covalentes a los lípidos de la membrana plasmática, o intrínsecas, firmemente incrustadas en la bicapa. Además de lípidos y proteínas, la membrana también contiene carbohidratos, que en la mayoría de los casos son cadenas de azúcares simples o polisacáridos (Arenas et al., 2010).

El espermatozoide es una célula altamente polarizada, por lo que los componentes que conforman su membrana son capaces de moverse distribuyéndose en dominios específicos que reflejan su heterogeneidad a nivel funcional, estructural y bioquímico (Jones, 2002). Estos dominios se forman durante la espermiogénesis y continúan modificándose en su paso por el

epidídimo para terminan de redefinirse en el tracto reproductor femenino (Bearer and Friend, 1990). Además, la integridad de los mismos es necesaria para que el espermatozoide sea capaz de realizar sus funciones, ya que cada uno de ellos juega un papel específico en la serie de eventos que llevan a la fecundación (Villarroya and Scholler, 1986).

A nivel de membrana, en la cabeza se pueden encontrar tres estructuras: el acrosoma, la banda ecuatorial y el postacrosoma (**Figura 5**). El acrosoma, ya descrito anteriormente, está delimitado por las membranas acrosomal externa y acrosomal interna. En la parte posterior del acrosoma y separándolo del postacrosoma se localiza el segmento ecuatorial, que ha sido descrito como el sitio inicial de la fusión de membranas entre el espermatozoide y el ovocito, además de ser en sí mismo una barrera a la difusión de constituyentes de membrana entre la región acrosomal y la región postacrosomal (Bearer and Friend, 1990). Por último, la membrana de la región postacrosomal tiene la capacidad de adherirse y fusionarse con la membrana plasmática del oocito y está limitada por el anillo posterior, cuya función es conectar la cabeza y la cola (Toshimori and Eddy, 2015).

En cuanto al flagelo, al igual que su estructura interna, su membrana plasmática se diferencia en pieza intermedia, pieza principal y pieza final.



**Figura 5:** Esquema de la estructura de un espermatozoide maduro y de sus componentes principales (modificado de Young and Heath, n.d.)

La investigación de la interacción entre gametos ha revelado que está coordinada por los dominios especializados que recubren la región anterior de la cabeza del espermatozoide. Estos dominios se forman durante las últimas fases de la espermatogénesis, antes de ser modificado dinámicamente al pasar por los tractos reproductivos masculino y femenino (Reid et al., 2011).

## 1.4 BASES FISIOLÓGICAS DE LA FECUNDACIÓN

### 1.4.1 Capacitación espermática

Para que el reconocimiento entre gametos sea posible, el espermatozoide debe ser funcionalmente maduro, es decir, debe haber completado una serie de cambios moleculares y fisiológicos durante su paso por el tracto genital femenino. Estos cambios ocurren durante un proceso denominado capacitación y es esencial para que el espermatozoide adquiera la capacidad fecundante (Chang, 1951; De Jonge and Barratt, 2017; Yanagimachi, 1984).

Una vez que se produce la eyaculación en el aparato reproductor femenino, los espermatozoides se activan y comienzan a batir su flagelo progresivamente hacia el oviducto, donde se almacenan en el reservorio del istmo uterino uniéndose al epitelio (Suarez, 1998). Cuando se acerca el momento de la ovulación, el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y la albúmina presentes en el fluido oviductal son las encargadas de iniciar el proceso de capacitación espermática, de manera que los espermatozoides puedan abandonar el istmo y dirigirse hacia la trompa de Falopio en busca del ovocito (**Figura 6**).

Inicialmente, el  $\text{HCO}_3^-$  atraviesa la membrana plasmática a través de un cotransporte mediado por un canal de sodio ( $\text{Na}^+$ ) o por difusión como el dióxido de carbono. Una vez en el interior de la membrana espermática, el  $\text{HCO}_3^-$  activa la adenilil ciclasa soluble (sAC), provocando un aumento de los niveles de adenosina monofosfato cíclica (cAMP; del inglés *cyclic*

*adenosine monophosphate*). El cAMP producido va a activar a su vez una proteína quinasa (PKA; del inglés *Protein Kinase A*) que va a fosforilar los residuos de tirosina de diferentes sustratos además de incrementar la actividad de intercambio lipídico en la bicapa (De Jonge and Barratt, 2017).

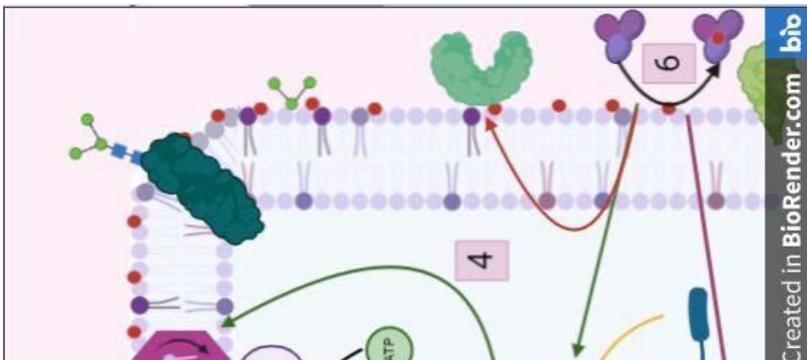
De manera simultánea, el  $\text{HCO}_3^-$  va a activar los canales de potasio ( $\text{K}^+$ ) de la membrana, provocando la salida de este ion al medio extracelular. Este intercambio iónico provoca un aumento de iones de carga negativa en el interior celular con respecto al exterior, lo que se traduce en la hiperpolarización de la membrana plasmática (De Jonge and Barratt, 2017).

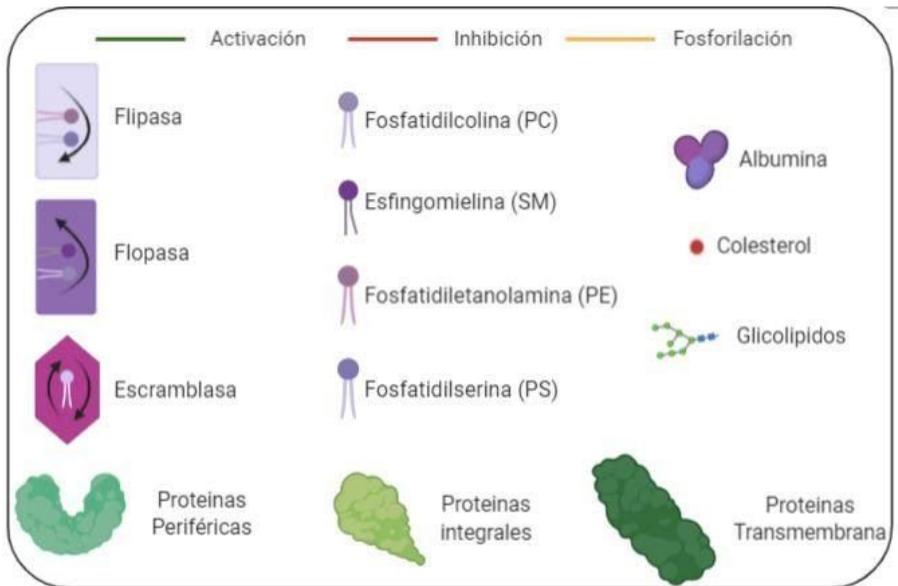
Llegados a este punto, la albúmina ejerce su papel secuestrando el colesterol presente en la superficie de la membrana espermática, ocasionando no solo la disrupción de dominios lipídicos sino también la debilitación de la unión de proteínas periféricas. La pérdida de estas proteínas durante la capacitación conduce a una reorganización de la membrana plasmática haciéndola fusogénica, cualidad imprescindible durante fases más avanzadas de la fecundación. Además, es importante tener en cuenta que la pérdida de las proteínas periféricas y los cambios en la membrana exponen ciertos receptores de superficie a través de los cuales el espermatozoide va a ser capaz de interactuar con su entorno (De Jonge and Barratt, 2017).

Así, el balance general de los cambios moleculares que ocurren durante la capacitación quedaría de la siguiente manera:

- El flujo de iones resulta en el aumento intracitoplasmático de  $K^+$  y  $Ca^{+}$ .
- El secuestro del colesterol resulta en una relocalización de lípidos y proteínas de membrana.
- Se produce un incremento de la fosforilación de tirosinas.

La importancia de la fosforilación de tirosinas en las proteínas flagelares durante la capacitación radica en su correlación con el desarrollo de una motilidad denominada *hiperactivada*, caracterizada por un patrón de batida de los flagelos muy vigoroso, que permite al espermatozoide separarse del epitelio del oviducto y desplazarse hacia la trompa de Falopio, donde se va a producir la fecundación (Suarez, 2008).





**Figura 6:** Cascada molecular durante la capacitación espermática.

1: El bicarbonato penetra en la célula mediante cotransporte de sodio o por difusión; 2: El bicarbonato intracelular activa la sAC, aumentando la producción de cAMP; 3: El cAMP activa la PKA, que fosforila los residuos de tirosina de diferentes proteínas; 4: La PKA induce una disminución en la estabilidad de la distribución lipídica de la membrana; 5: El bicarbonato activa los canales de potasio, provocando la hiperpolarización de la membrana que abre los canales de calcio voltaje-dependientes; 6: La albumina secuestra el colesterol presente en la membrana plasmática, aumentando la fluidez de la misma y provocando con ello una pérdida y redistribución de los componentes de la membrana (lípidos y proteínas mayormente), además de un aumento en la actividad de la tirosina quinasa (Creado con BioRender.com; adaptado de De Jonge and Barratt, 2017).

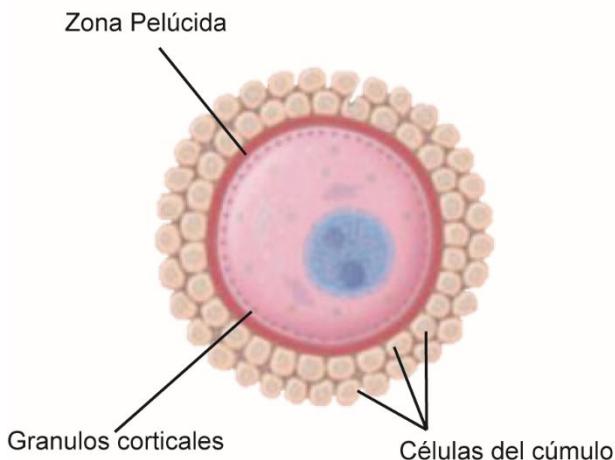
## 1.4.2 Efecto de las células del cúmulo y de la ZP

Antes de llegar al gameto femenino, el espermatozoide debe atravesar las células del cúmulo que lo rodean. Estas células productoras de progesterona tienen una matriz proteínica viscoelástica consistente, en parte, en ácido hialurónico.

A pesar de que los fluidos viscoelásticos pueden reducir la velocidad de natación de los espermatozoides (Tung et al., 2015), se ha demostrado que el ácido hialurónico de la matriz estimula, entre otros factores, la motilidad asociada a la capacitación de los espermatozoides, por lo que este componente de la matriz podría ayudar a los espermatozoides hiperactivados a penetrar en el cúmulo para llegar a la zona pelúcida (Kim and Kim, 2013; Suarez, 2016; Wróbel et al., 2014).

Una vez el espermatozoide ha atravesado las células del cúmulo y se aproxima al ovocito, se produce una unión inicial con la matriz extracelular que recubre al gameto femenino, conocida como zona pelúcida. La ZP es una cubierta que rodea a la membrana plasmática del ovocito formada por un conjunto de glicoproteínas características de cada especie. Una de estas glicoproteínas, llamada ZP3, es la responsable de la inducción de la reacción acrosómica junto con la progesterona liberada por las células del cúmulo (Patrat et al., 2000) (**Figura 7**).

Esta unión a la ZP3 es el último estímulo necesario para activar el metabolismo enzimático del acrosoma, desencadenando el último evento molecular previo a la fusión de gametos, denominado reacción acrosómica (RA).



**Figura 7:** Ilustración de la estructura de un ovocito rodeado por las células del cúmulo que el espermatozoide deberá atravesar (modificada de Ross and Pawlina, 2016)

### 1.4.3 Reacción acrosómica

La RA, se trata de un proceso exocitótico que consiste en la fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) con la membrana plasmática (MP), resultando en la exposición y liberación del contenido acrosomal al medio extracelular (Ramalho-Santos et al., 2002).

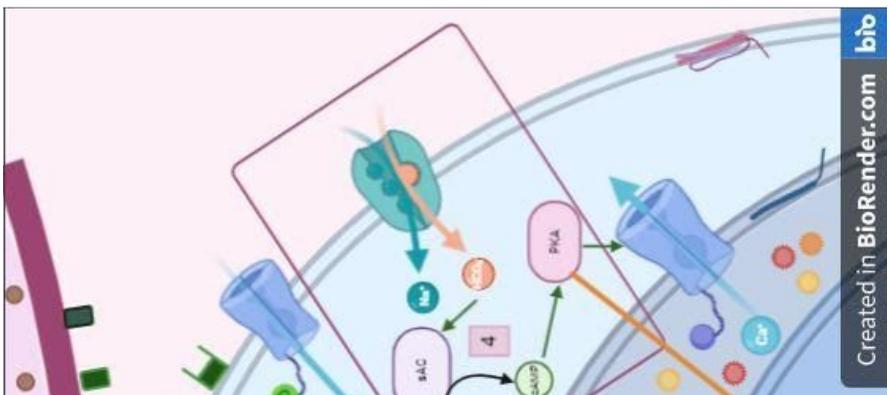
Tanto la disminución en el espesor del glicocáliz (Cross and Overstreet, 1987) como la disminución de la razón colesterol/

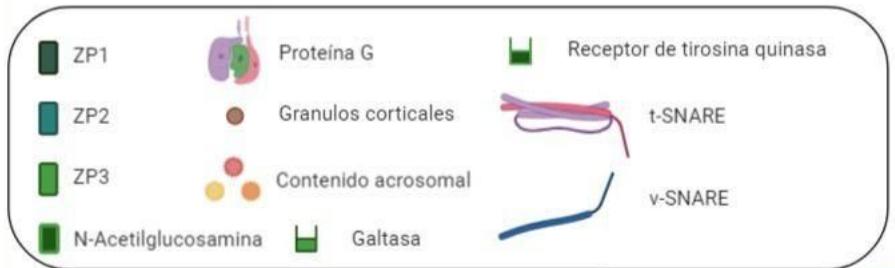
fosfolípidos que ocurren durante la capacitación, resultan en un incremento de la permeabilidad de la membrana al calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y un aumento de la fluidez de la membrana (Shapiro, 1987). De esta manera, cuando el espermatozoide llega a la zona pelúcida (ZP), su membrana se encuentra preparada para la interacción.

Para que la reacción acrosómica tenga lugar, deben darse dos condiciones imprescindibles: una alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la MP y el contacto del espermatozoide con la ZP3 del ovocito. Durante la capacitación, como se ha explicado anteriormente, se produce una despolarización de la MP, provocando la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (De Jonge and Barratt, 2017). Además, el aumento de la producción de cAMP provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el interior acrosomal hacia el interior de la MP a través de un canal de calcio dependiente de cAMP y/o de PKA (Patrat et al., 2000). Además de la apertura de canales de calcio, la PKA actúa sobre sustratos aún desconocidos (probablemente proteínas) que modularían directamente la fusión de la membrana (fusogénicos).

El contacto con la ZP3 es el estímulo que finalmente dispara la cascada molecular que lleva a la liberación del contenido acrosomal. Esta unión se produce a través del receptor de tirosina quinasa (TKR; del inglés *Tyrosine Kinase Receptor*) iniciando la cascada de activación de la fosfolipasa  $\text{C}\gamma 1$  y

mediante la Galtasa acoplada a proteína G que inicia la cascada de la fosfolipasa C $\beta$ 1 (PLC $\beta$ 1; del inglés *Phospholipase C  $\beta$ 1*) (Olivera et al., 2006; Wassarman et al., 2004). De esta manera, la unión a la ZP3 resulta en la activación de la fosfolipasa C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1; del inglés *Phospholipase C  $\gamma$ 1*) como resultado de la entrada de Ca<sup>2+</sup> al interior de la MP tras la fosforilación de su transportador. La función de la PLC $\gamma$ 1 durante la reacción acrosómica es la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para producir inositol trifosfato (InsP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). Cuando el InsP<sub>3</sub> se une a su receptor localizado en la MAE, activa un canal de Ca<sup>2+</sup> provocando la salida de este ion desde el acrosoma hacia el interior de la MP. A su vez, el DAG estimula la producción de lípidos fusogénicos por parte de la fosfolipasa A2 (PLA2) (Patrat et al., 2000). De manera simultánea, la PLC $\beta$ 1 incrementa la actividad de la sAC, ya explicada anteriormente (**Figura 8**).

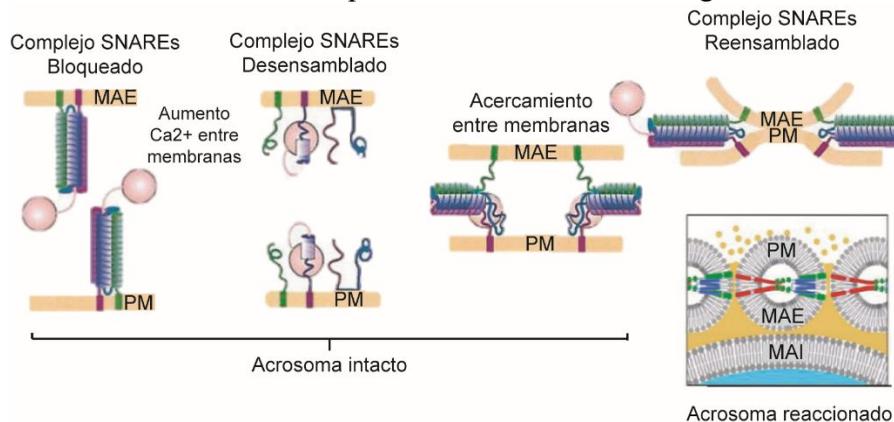




**Figura 8:** Cascada molecular que tiene lugar durante la reacción acrosómica, continuando procesos ya iniciados durante la capacitación (cuadrados rojos). **1:** La despolarización de la membrana plasmática provoca la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio intermembrana; **2:** La unión de la ZP3 a la TKR provoca la fosforilación y apertura de canales de calcio, mientras que su unión con el receptor Galtasa promueve la actividad de la adenilil ciclasa soluble vía fosfolipasa  $\beta 1$ ; **3:** El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa la fosfolipasa  $\text{C}\gamma 1$ , dando lugar a  $\text{InsP}_3$  y DAG.  $\text{InsP}_3$  actúa como sustrato abriendo canales de calcio de la MAE, mientras que el DAG estimula la formación de lípidos fusogénicos a través de la fosfolipasa A2; **4:** El cAMP generado por la sAC activa los canales de calcio dependientes de nucleótidos que se encuentran en la MAE, incrementando la salida de este ion hacia el interior de la MP. Además, activa la PKA fomentando la activación de diferentes proteínas de fusión (Creado con BioRender.com; adaptado de De Jonge and Barratt, 2017).

Llegados a este punto, la cascada molecular que ocurre durante la reacción acrosómica ha provocado un incremento considerable de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espacio entre la MP y la MAE y la producción de lípidos fusogénicos y proteínas

de fusión. Estos parámetros van a facilitar la fusión de membranas mediadas por proteínas SNARE (del inglés *Soluble NSF Attachment Protein Receptor*). Estas proteínas se encuentran, inicialmente bloqueadas, en las membranas plasmática y acrosómica externa. La alta concentración de  $Ca^{2+}$  entre estas membranas provoca la entrada de agua en el



acrosoma, hinchándolo hasta que la MP y MAE se encuentran lo suficientemente cerca como para que los complejos t-SNARE (MP) y v-SNARE (MAE) se ensamblen entre ellos de manera irreversible (De Blas et al., 2005; Söllner and Söilner, n.d.) (**Figura 9**).

**Figura 9:** Modelo de la dinámica del ensamblaje y desensamblaje de las proteínas SNARE durante la reacción acrosómica modificado de (modificado de De Blas et al., 2005; Söllner and Soilner, n.d.).

La formación de vesículas provocada por la interacción de las proteínas SNARE de la MP y la MAE desencadena la liberación del contenido acrosomal, consistente sobre todo en

hialuronidasas, proteinasas, esterasas, neuraminidasas, y fosfatasas ácidas (Khawar et al., 2019). Las enzimas liberadas durante este evento molecular son capaces de disolver la matriz de la ZP para que el espermatozoide pueda atravesarla y llegar al ooplasma. Además, este proceso deja al descubierto la membrana acrosomal interna y sus receptores, implicados en el reconocimiento entre la ZP y el espermatozoide (Cardona *et al.*, 2006). (Auer *et al.*, 2000).

Por último, la liberación de enzimas acrosomales induce la capacidad fusogénica del segmento ecuatorial y la región postacrosomal (Knobil and Neill, 2006). De esta manera, cuando se produce el contacto entre estas zonas del espermatozoide y el ooplasma, se desencadena la fusión del espermatozoide con la membrana vitelina del ovocito y la posterior fusión de pronúcleos (Töpfer-Petersen, 1999), induciendo la liberación de gránulos corticales que provocan el endurecimiento de la membrana plasmática del ovocito para impedir la entrada de más espermatozoides, evitando así la polispermia y la generación de embriones inviables (Gupta, 2018).

## 1.5 CAPACITACIÓN E INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA *IN VITRO*

### 1.5.1 Gradientes de densidad y *swim-up*

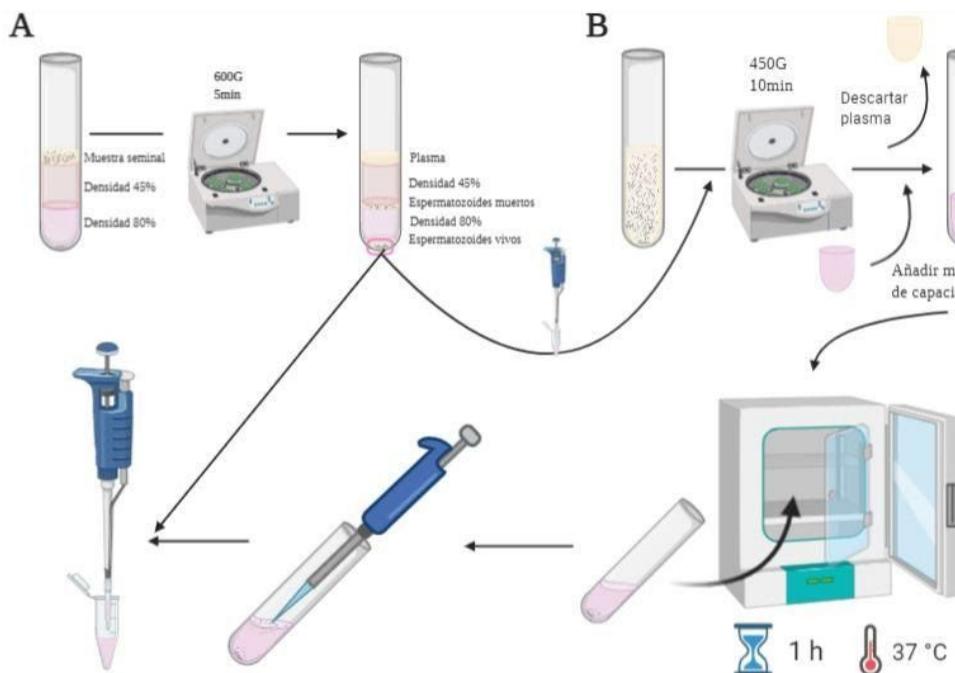
Según los protocolos clínicos actuales (World Health Organization, 2010), existen dos técnicas fundamentales de selección espermática *in vitro*: los gradientes de densidad y el *swim-up* (**Figura 10**). Los gradientes discontinuos de densidad proporcionan una buena separación entre espermatozoides y otros tipos de células y desechos. Este método consiste en la centrifugación del plasma seminal sobre gradientes de densidad, típicamente con una capa superior de 40% (v/v) y una capa inferior de 80% (v/v), que separa las células por su densidad. Además, los espermatozoides móviles son capaces de nadar activamente a través del material del gradiente para formar un pellet blando en el fondo del tubo (World Health Organization, 2010).

La preparación de los espermatozoides mediante la centrifugación con gradiente de densidad (**Figura 10a**) suele dar lugar a una fracción de espermatozoides muy móviles, libres de desechos, leucocitos contaminantes, células germinales y no germinales (World Health Organization, 2010). Pero, como se ha explicado anteriormente en esta tesis, es necesario que los espermatozoides se capaciten antes de ser capaces de fecundar un ovocito.

Por eso, esta técnica ya estandarizada se utiliza en combinación con el *swim-up* para capacitar y recuperar los

espermatozoides previamente a su uso en una TRA (World Health Organization, 2010).

La técnica del *swim-up* consiste en concentrar mediante centrifugación todas las células del eyaculado, o los



espermatozoides móviles previamente separados mediante la técnica del gradiente, en el fondo de un tubo y añadir una pequeña cantidad de medio de cultivo que imita la composición química e iónica del fluido oviductal. De este modo, los espermatozoides que estas condiciones sean capaces de desarrollar la movilidad hiperactivada asociada a la capacitación, nadarán desde el concentrado del fondo hasta la superficie el medio de cultivo, de donde serán recuperados. Los

medios usados con este fin presentan albúmina como molécula receptora de esteroides, e iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{HCO}_3^-$ , para mantener la homeostasis y facilitar los procesos de transducción de señales propios de la capacitación (De Jonge, 2017). Con esta técnica también es posible separar a los espermatozoides del resto de células del eyaculado, que se quedan en el fondo (Esteves et al., 2000), permitiendo así descartar los leucocitos presentes en el plasma seminal, que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) dañando a los espermatozoides. De esta manera, la utilización de esta técnica, por sí sola o tras la selección por gradientes de densidad, permite la selección de poblaciones espermáticas con alta movilidad (Austin, 1952), las cuales presentan una alta proporción de espermatozoides morfológicamente normales (Katz et al., 1982) (**Figura 10b**).

**Figura 10:** Descripción comparativa de los procedimientos actuales de preparación seminal previos a una TRA. **A:** Centrifugación con gradiente de densidad y **B:** *Swim-up*. Creado con BioRender.com

### **1.5.2 Inducción y valoración de la reacción acrosómica**

Como se ha visto en el apartado 1.4.3, la RA es un proceso excitotónico imprescindible para que el espermatozoide pueda penetrar en las envolturas del ovocito y fusionarse con él. Esta reacción en humanos se desencadena cuando los espermatozoides se unen a la zona pelúcida, pero también deben

darse otros factores que previamente hayan preparado a la célula para este evento molecular. De entre estos factores, el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , uno de los eventos iniciadores en la RA *in vivo*, se ha utilizado ampliamente como inductor de la reacción acrosómica *in vitro* por su eficacia y fácil manejo (World Health Organization, 2010). De manera rutinaria en muchos laboratorios, la inducción del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el uso de un ionóforo de calcio es una forma de comprobar la capacidad de los espermatozoides capacitados para llevar a cabo la RA (Aitken et al., 1993).

Tras la inducción de la RA *in vitro*, el estado acrosómico puede evaluarse por microscopía o citometría de flujo (Fenichel et al., 1989; Henley et al., 1994; Cooper & Yeung, 1998) tras el marcaje con lectinas conjugadas con fluorocromos, como *Pisum sativum* (aglutinina de guisantes, PSA) para humanos o *Arachis hypogaea* (lectina de cacahuete, PNA) para otros animales (Cross, 1995) (Figura 11a).

### 1.5.3 Marcadores moleculares

Teniendo en cuenta que uno de los fallos más comunes durante fecundación está relacionado con el reconocimiento entre los gametos (Nixon et al., 2015), conocer la localización de las moléculas espermáticas implicadas en este proceso puede ser de gran ayuda a la hora de diagnosticar casos de infertilidad masculina, así como para aplicar la técnica de reproducción

asistida más adecuada. De hecho, varias investigaciones se han centrado en el estudio de biomarcadores espermáticos que ayuden a entender y evaluar la fertilidad en el varón de manera precisa, ampliando los parámetros evaluados en un seminograma convencional.

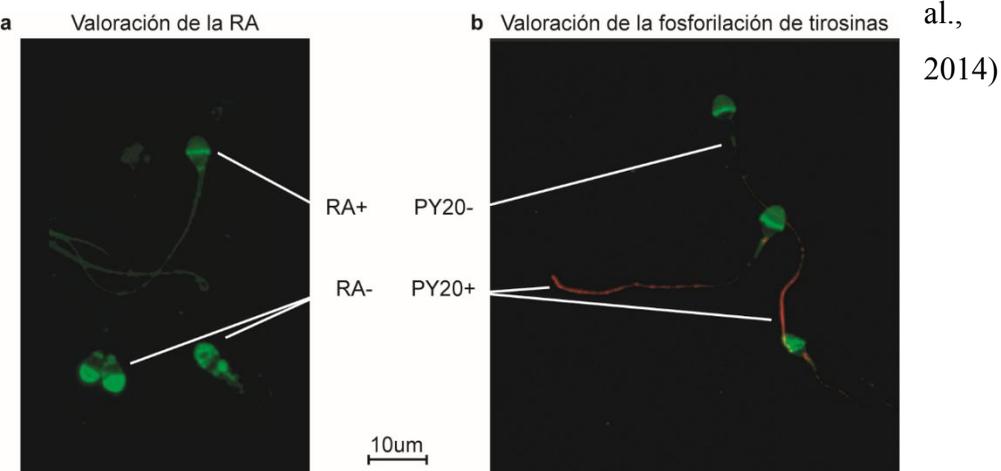
Uno de los biomarcadores más prometedores debido a su papel durante la capacitación es la presencia de tirosinas fosforiladas en el flagelo espermático. Este parámetro es comúnmente utilizado como biomarcador de capacitación, ya que se trata de uno de los acontecimientos que se dan durante este proceso y resulta imprescindible por su papel en el desencadenamiento de la motilidad hiperactivada, la unión a la zona pelúcida, la reacción acrosómica y fusión de los gametos (Naresh and Atreja, 2015).

Como ya se ha explicado anteriormente, entre los factores implicados en la fosforilación de tirosinas se pueden encontrar (Naz and Rajesh, 2004):

- Pérdida de colesterol: Durante la capacitación, la pérdida de colesterol por parte de la membrana plasmática del espermatozoide desencadena la activación de cascadas de señalización que regulan la fosforilación de tirosinas.
- Concentración  $\text{Ca}^{2+}$ : La concentración de calcio extracelular durante la capacitación afecta a la fosforilación de tirosinas.

- $\text{HCO}_3^-$ : Provoca un aumento del pH intracelular y regula la cantidad de AMPc, modulando la motilidad e hiperactivación espermática mediante la fosforilación de tirosinas.

Estudios previos han manifestado que la fosforilación de tirosinas flagelares aumenta significativamente tras el proceso de capacitación (Sakkas et al., 2003), demostrando su importancia, ya que la inhibición en la expresión de las fosfotirosinas puede afectar a la fertilidad masculina (Kwon et



(Figura 11b).

**Figura 11:** Imagen propia de microscopía de fluorescencia que muestra (a) células con el acrosoma intacto (RA-) y tras reacción acrosómica (RA+) y (b) células presentando tirosinas fosforiladas en su flagelo tras la capacitación.

Por otra parte, se ha propuesto que el reconocimiento espermatozoide-ovocito podría ser un proceso altamente

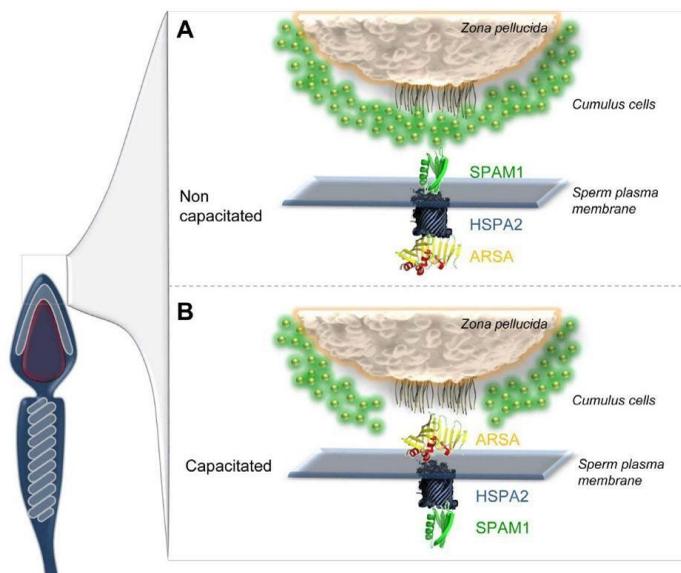
redundante mediado por varios receptores de la ZP que son transportados a la superficie de la célula y / o ensamblados en complejos funcionales durante la capacitación bajo la influencia de chaperonas moleculares (Dun et al., 2012; Redgrove et al., 2011).

Entre las chaperonas implicadas en este proceso en espermatozoides humanos, una proteína miembro de la familia de proteínas del choque térmico (HSP, del inglés *Heat Shock Protein*) 70, la HSPA2, ha ganado interés por su participación en el complejo proteico formado por la Arilsulfatasa A (ARSA), HSPA2 y la molécula de adhesión espermática 1 (SPAM1, del inglés *Sperm Adhesion Molecule*) (Nixon et al., 2015).

Las chaperonas de la familia HSP70 tienen un peso molecular de 70 kDa y están formadas por un dominio **ATPasa** N-terminal conservado, un dominio de unión al sustrato y un dominio C-terminal que interviene como una cubierta para el dominio de unión al sustrato (Nixon et al., 2015). Por su parte, HSPA2 se expresa en la meiosis durante la espermatogénesis formando parte del complejo sinaptonémico que interviene en los procesos de recombinación (Huszar et al., 2000). Además, también está involucrada en la reparación del DNA, el reemplazo de histonas por protaminas y la eliminación del exceso de citoplasma durante las espermiogénesis,

considerándose, por tanto, un biomarcador de madurez espermática y fertilidad (Motiei et al., 2013).

A través del uso combinado de análisis de ultraestructura, inmunolocalización, y citometría de flujo se ha evidenciado que HSPA2 se localiza intracelularmente en la membrana espermática (Redgrove et al., 2012). De esta manera, desempeña una función indirecta en la mediación del reconocimiento espermatozoide-ovocito al encargarse de orientar SPAM1 de manera que se exprese en la superficie de las células para mediar la dispersión de la matriz rica en hialuronano de la masa del cúmulo. A medida que los espermatozoides penetran en la masa del cúmulo y completan su capacitación, HSPA2 reorienta el



complejo receptor para que las células expresen ARSA en su superficie para mediar la unión al ZP (**Figura 12**).

**Figura 12:** Modelo de expresión de SPAM1 y ARSA mediada por el HSPA2 en la superficie de los espermatozoides humanos (Redgrove et al., 2012)

En lo que respecta a ARSA (E.C. 3.1.6.8.), ha sido identificada en células espermáticas de diferentes especies animales como el ratón (Carmona, 2002; Tantibhedhyangkul et al., 2002), el cerdo (Carmona et al., 2002) o el conejo (Nikolajczyk and O’Rand, 1992). Mientras que en espermatozoides humanos esta proteína de reconocimiento de ZP se conocía como ARSA, en otras especies animales se denominó P68 hasta que, en 1999, Tanphaichitr purificó este componente de la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo y reportó una elevada similitud entre tres secuencias de péptidos trípticos de P68 y la secuencia de ARSA, sugiriendo que P68 es ARSA (Tanphapichitr et al., 1998).

A día de hoy, ARSA está bien reconocida en sus dos formas:

- Forma acrosómica: enzima con capacidad para desulfatar diversos arilsulfatos, artificiales o naturales, como el SGG y el SGC (sulfogalactosilceramida), presentes en el cerebro, las células epiteliales y las células espermáticas (Mehl y Jatzkewitz, 1968; Rahi y Srivastava, 1983).
- En la superficie espermática: proteína en forma de dímero, de 68-kDa. Se le asignan dos papeles durante la fecundación en ratones:

- o Mediar la dispersión de las células del cúmulo (Wu et al., 2007).

- o Interactuar con la ZP a través de la unión a residuos de azúcar sulfatado presentes en los glicanos de la ZP (Carmona, 2002).

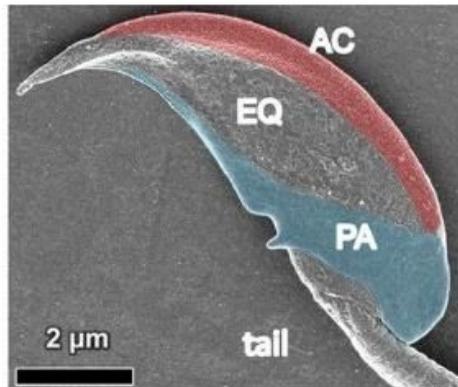
Los estudios existentes con respecto a la localización en la superficie espermática de esta proteína en humanos muestran que después de 180 minutos de incubación<sup>27,29</sup>, ARSA se expresa en la superficie de los espermatozoides y se co-localiza, junto con HSPA2 y SPAM1, en la región del periacrosomal. Estos estudios, sin embargo, no consideraron otros tiempos de capacitación<sup>23 y OMS</sup> ni estudiaron la distribución de esta proteína de manera individual.

## 1.6 EL RATÓN COMO MODELO EXPERIMENTAL

Como se ha mencionado anteriormente, la incapacidad del espermatozoide de reconocer y unirse a la ZP es uno de los problemas más comunes durante la fecundación. Es por este motivo que, durante la estancia en el Instituto Nacional de Investigación Agraria de Madrid, se utilizó el ratón como modelo para realizar la evaluación de la proteína HSPA2 en espermatozoides que habían sido capaces o no de unirse a la ZP de ovocitos tras una fecundación *in vitro* (FIV).

Al igual que en humanos, las células germinales masculinas de ratón se diferencian en los túbulos seminíferos y maduran durante su paso por el epidídimo antes de sufrir una serie de cambios durante la capacitación en el tracto reproductivo femenino (Benavides and Guénet, 2003). Sin embargo, en el caso de los múridos como ratones y ratas se postula que los altos niveles de competencia espermática han estimulado modificaciones en la forma, curvatura y longitud de la cabeza, produciendo un gancho en la parte apical (morfología falciforme).

Hasta hace unos años, se pensaba que la fecundación en humanos y ratones seguían los mismos pasos. Sin embargo, el lugar de inicio de la RA, así como el desencadenante de este proceso *in vivo*, se ha cuestionado en varias ocasiones. Estudios como el de Jin y colaboradores (Jin et al., 2011) presentaron datos indicando que la RA en ratones se inicia antes de que los espermatozoides contacten con la ZP, actuando las células del cúmulo como inductoras (Gupta et al., 2009; Hirohashi and Yanagimachi, 2018; Wassarman and Litscher, 2012).



**Figura 13:** Imagen de microscopía electrónica de barrido que ilustra la morfología de la cabeza de un espermatozoide de ratón. Se puede diferenciar el acrosoma (AC), la región ecuatorial (EQ) y la región postacrosomal (PA) (Satouh et al., 2012).

## 1.7 EXPRESIÓN GÉNICA E INFERTILIDAD

En espermatozoides maduros puede encontrarse lo que se considera un registro histórico de la expresión génica ocurrida durante la espermatogénesis en forma de restos de RNA mensajero (RNAm; del *inglés ribonucleic acid*) (Jodar et al., 2013; Martins and Krawetz, 2005; Pelloni et al., 2018). A pesar de su estado transcripcional aparentemente inerte, estas moléculas de RNA pueden ser transferidas al ovocito durante la fecundación (Dadoune, 2009; Lalancette et al., 2008; Ostermeier et al., 2004) subrayando la importancia de discernir si son un vestigio de la actividad genética pasada o si tienen un papel activo en el desarrollo post-fecundación.

En los últimos años, se ha intentado identificar cualquier correlación entre el perfil de RNA espermático y la infertilidad masculina, llegando a demostrar que algunas de estas moléculas de RNA específicas de espermatozoides desempeñan un papel fundamental en la motilidad espermática, la capacitación y reacción acrosómica (Jodar et al., 2015; Wang et al., 2004). Para este fin, la PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR; del inglés *reverse transcription- quantitative polymerase chain reaction*) se ha convertido en un recurso clave debido a su capacidad para analizar la expresión de genes relevantes de manera robusta y fiable (Enciso et al., 2018).

Sin embargo, entre las dificultades del uso de la RT-qPCR encontramos que es una técnica dependiente de la cantidad de material inicial, la eficiencia enzimática, y las diferencias de actividad transcripcional entre las células (Bustin, 2002, 2000; Cappelli et al., 2008; Romanowski et al., 2007; Vandesompele et al., 2002), por lo que, para la correcta medición de los niveles de expresión mediante esta técnica, es necesario contar con un control interno estable que nos sirva para normalizar los datos obtenidos. Esta normalización se lleva a cabo mediante el uso de genes de referencia o genes housekeeping (HK) (Ginzinger, 2002).

Un gen de referencia ideal sería aquel que no se ve afectado por procesos fisiológicos, patológicos ni por el procedimiento

experimental, por lo que, para su correcta selección, sería necesario evaluar múltiples genes en muestras de diferentes condiciones fisiológicas, patológicas y experimentales (Cappelli et al., 2008). Debido a las características que debe cumplir, es poco probable que exista un solo gen housekeeping perfecto (Romanowski et al., 2007). Además, se ha demostrado que el uso de un solo gen como gen de referencia es susceptible a tener errores en la interpretación de los resultados de la RT-qPCR (Lee et al., 2002). En consecuencia, es común utilizar más de un gen de referencia para normalizar las expresiones génicas cuando se trabaja con RT-qPCR (Huggett et al., 2005; Robinson et al., 2007).

Desafortunadamente, existen muy pocos estudios sobre los posibles genes de referencia en muestras espermáticas (Amoako et al., 2013; Barragán et al., 2015; Suzuki et al., 2000; Thellin et al., 1999). Hasta ahora, se han utilizado genes como  $\beta$ -actina, Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina phosphoribosyltransferasa y 18S (Huggett et al., 2005; Small et al., 2008), de probada utilidad en otros tejidos biológicos (Eisenberg and Levanon, 2003), sin la validación de su expresión estable en diferentes condiciones (Robinson et al., 2007; Vandesompele et al., 2002).



## 2 JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA

---

La espermatogénesis y la espermiogénesis no son capaces de generar *per se* gametos con capacidad fecundante<sup>1,2</sup>. Esta capacidad se adquiere después de un tiempo en el tracto reproductor femenino, tras un proceso conocido como *capacitación*. Dicha capacitación es necesaria para que el espermatozoide sea plenamente capaz de interactuar con el ovocito (Austin, 1952, 1951; Chang, 1951; De Jonge, 2017; Florman and Fissore, 2014). Es el entorno del tracto femenino el que induce una secuencia de cambios fisiológicos en el espermatozoide, incluyendo la pérdida de colesterol (De Jonge, 2017), la reorganización de glicoconjugados (Paula Sáez-Espinosa et al., 2018), la fosforilación de proteínas (Matamoros-Volante et al., 2018) y la hiperactivación del flagelo (Quill et al., 2003; Shur et al., 2004; Stival et al., 2016). Debido a la importancia fisiológica de la fosforilación de tirosinas, así como de la capacidad del espermatozoide de liberar su contenido acrosomal durante la fecundación<sup>11,12,13</sup>, varios estudios han señalado estos procesos moleculares como potenciales biomarcadores de capacitación<sup>9,14-20</sup> (Nassar et al., 1999; Naz and Rajesh, 2004; Quill et al., 2003; Sakkas et al., 2003; Visconti et al., 1995).

La posibilidad de llevar a cabo dicho proceso *in vitro* ha permitido conocer los mecanismos moleculares que se dan durante la capacitación (Baker, 2016; De Jonge, 2017; Gervasi and Visconti, 2016; Jin and Yang, 2017), aunque existe cierta controversia sobre el tiempo óptimo que necesita una célula espermática para completar este proceso *in vitro* (De Jonge, 2017; Ostermeier et al., 2018). Hasta la fecha, se han utilizado las directrices establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en las que se sugiere una hora para la selección de células usando la técnica del *swim-up* en condiciones capacitantes (World Health Organization, 2010). Sin embargo, estos protocolos actuales no consideran la presencia de múltiples subpoblaciones en una sola muestra espermática, las cuales se ha demostrado que capacitan a diferentes tiempos de incubación (Ostermeier et al., 2018). Asimismo, estudios anteriores sugieren que los espermatozoides capacitados durante menos de dos horas no logran unirse a la zona pelúcida (ZP) del óvulo (Rankin et al., 2003), mientras que después de cuatro horas de capacitación *in vitro*, existe un elevado porcentaje de espermatozoides que si son capaces de unirse (Baibakov et al., 2012).

A pesar de esta disyuntiva, la capacitación *in vitro*, entre otras innovaciones, ha permitido desarrollar una alternativa eficaz para casos de disfunción reproductiva masculina mediante

la ICSI (Fang et al., 2012; Palermo et al., 1992, 1995; Xi et al., 2012). Aunque la esta técnica es actualmente una de las más utilizadas en las clínicas de reproducción asistida debido a sus beneficios en pacientes con baja calidad seminal (De Geyter et al., 2018; Gozlan et al., 2007; Palermo et al., 2015; Schwarze et al., 2017), su tasa de éxito se mantiene con un ciclo de embarazo a término de aproximadamente un 24% (De Geyter et al., 2018; Torabi et al., 2017).

Las bajas tasas de éxito que presentan las TRA pueden estar relacionadas con la interpretación de los resultados obtenidos tras un análisis seminal clásico (Oseguera-López et al., 2019; Pregl Breznik et al., 2013; Torabi et al., 2017; Vaughan et al., 2019). Así pues, resulta inevitable que durante el proceso de selección espermática previa a una TRA se acaben escogiendo espermatozoides de calidad insuficiente que normalmente no podrían participar en la fecundación natural, incrementando los riesgos durante el proceso de fecundación, implantación y embarazo (Alukal and Lamb, 2008; Avendaño et al., 2009; Celik-Ozenci et al., 2004; Mokánszki et al., 2012; Oseguera-López et al., 2019; Parmegiani et al., 2010; Pregl Breznik et al., 2013; Tournaye, 2003; Vaughan et al., 2019).

A causa de la limitada sensibilidad de las actuales técnicas de valoración seminal la infertilidad causada por el factor masculino permanece sin diagnosticar con frecuencia (Agarwal

and Allamaneni, 2005; Chen et al., 2009; Hinting et al., 1990; Keegan et al., 2007; Oseguera-López et al., 2019; Sakkas et al., 1996; Saleh et al., 2002). De este modo, uno de los retos actuales en el ámbito de la reproducción asistida es proporcionar biomarcadores adicionales para evaluar con más detalle la funcionalidad de los espermatozoides (Said and Land, 2011; Yetunde and Vasiliki, 2013; Zhao et al., 2014).

Teniendo en cuenta que uno de los problemas más frecuentes durante la fecundación humana es la incapacidad del gameto masculino para reconocer y adherirse a la ZP (Liu and Baker, 2000; Redgrove et al., 2012; World Health Organization, 2010) (E. Bromfield y otros, 2015; Nixon y otros, 2015), los estudios en este campo se han centrado en varios receptores moleculares espermáticos (Aitken and Nixon, 2013) candidatos a interactuar con la ZP durante la fecundación (Bernabò et al., 2014; Dun et al., 2012) y en su regulación por chaperonas moleculares (Dun et al., 2012; Redgrove et al., 2012, 2011).

Entre las chaperonas que participan en este proceso en espermatozoides humanos, un miembro de la familia de las proteínas de choque térmico (HSP) 70, la proteína de choque térmico A2 (HSPA2), ha llamado la atención de diversos grupos de investigación en el campo del reconocimiento entre gametos (Nixon et al., 2015) debido a su participación en la dinámica tanto de una molécula de adhesión a la hialuronidasa (SPAM1)

como de una molécula que actúa como receptor de la ZP (ARSA) (Redgrove et al., 2013). Este complejo está orientado de manera que SPAM1 se expresa en la superficie de las células para mediar la dispersión de la matriz rica en hialuronano de la masa del cúmulo. A medida que estas células penetran en la masa del cúmulo y completan su capacitación, HSPA2 reorienta el complejo para que las células expresen ARSA en su superficie y sean capaces de mediar la unión a la ZP (Redgrove et al., 2011). Es por esta razón que la expresión disminuida de HSPA2 en espermatozoides se relaciona con un reducido número de sitios de unión a la ZP (Dix et al., 1996; Huszar et al., 2000; Motiei et al., 2013; Redgrove et al., 2013) y de receptores de ácido hialurónico en espermatozoides (Celik-Ozenci et al., 2004).

Además, antes de la fecundación, la HSPA2 testicular ha demostrado ser un componente importante durante la espermatogénesis, donde esta chaperona está implicada en la reparación del daño espermático en casos de varicocele (Afiyani et al., 2014). Adicionalmente, existe una relación proporcional entre la localización de HSPA2 en el tejido testicular y la tasa de éxito tras una ICSI (Tian et al., 2014).

De esta manera, ha sido posible determinar el valor de HSPA2 como biomarcador de éxito tanto en casos de ICSI como de FIV, evaluando su presencia en los espermatozoides (Ergur et

al., 2002; Heidari et al., 2018) o valorando su contenido en el tejido testicular (Tian et al., 2014).

Los informes más relevantes sobre la localización de HSPA2 (Huszar et al., 2000; Motiei et al., 2013; Redgrove et al., 2013) se basan en evidencias de la colocalización de esta proteína con ARSA y SPAM1 en la región periacrosómica de la cabeza del espermatozoide. Esta premisa, sin embargo, es controvertida ya que otros autores (Motiei et al., 2013) encontraron esta chaperona distribuida a través de los diferentes dominios de la cabeza del espermatozoide (acrosoma, postacrosoma y banda ecuatorial) y asociaron estas diferentes distribuciones con la fertilidad. Sin embargo, en los estudios mencionados anteriormente se utilizó un tiempo de capacitación de 3 horas, estándar en el campo de investigación de la Biología de la reproducción. En ningún caso se tuvo en cuenta ni el tiempo de 1 hora, recomendado por la OMS y usualmente utilizado en los tratamientos de reproducción asistida (World Health Organization, 2010), ni el tiempo de 4 horas, sugerido para la obtención de altas cantidades de células capaces de unirse a la ZP (Baibakov et al., 2012).

Por otra parte, los estudios del complejo en su conjunto han destacado que la deficiencia en la expresión de ARSA ocasiona un fallo en la adhesión de los espermatozoides a la ZP<sup>30</sup>, haciendo evidente la importancia de esta proteína durante el

reconocimiento primario entre gametos. Dada la relevancia de ARSA durante el proceso de fecundación, en la bibliografía podemos encontrar datos sobre la expresión superficial de esta proteína en espermatozoides humanos antes y tras la incubación en medio de capacitación durante 3 horas<sup>27,29</sup>. Estos estudios evidencian de nuevo la expresión de ARSA en la superficie espermática tras la capacitación y su colocalización con HSPA2 y SPAM1 en la región periacrosomal de la cabeza de espermatozoides tras este tiempo de incubación, pero sin tener en cuenta los cambios individuales de estas proteínas durante la capacitación, ni el tiempo de 4 horas recomendado previamente para completar este proceso<sup>23</sup>.

Por otra parte, los estudios referentes a la caracterización y/o localización de este receptor de ZP están basados en las técnicas clásicas como la citometría de flujo o la microscopía de fluorescencia, que requieren de una recuperación antigénica previa al marcaje. Sin embargo, un método de evaluación cuantitativo más preciso sobre la ubicación de ARSA aportaría información esencial y detallada sobre el potencial de esta proteína para ser utilizada como biomarcador complementario al análisis seminal clásico.

En este campo, las investigaciones más prometedoras se han centrado en la mejora de la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM, del inglés *Field Emission*

*Scanning Electron Microscopy*) (Giepmans, 2008; Stoffel et al., 2002). Esta tecnología puede combinarse con imágenes de electrones retrodispersados (BSE, del inglés *Backscattered Electrons*), convirtiéndose en un método que permitiría no solo la visualización de proteínas externas, sino también el análisis de la superficie de la célula simultáneamente (Sant'Anna et al., 2005).

### 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

Teniendo en cuenta las referencias anteriores y la problemática actual en cuanto a protocolos y biomarcadores de capacitación, el propósito de esta tesis es el de ampliar los conocimientos actuales sobre receptores de membrana, su función y localización como componentes de la membrana plasmática de los espermatozoides humanos. Por ello, las hipótesis de trabajo en la que se basa la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. Los patrones de unión a HSPA2 y ARSA variarán entre espermatozoides en fresco y espermatozoides que hayan completado la capacitación, señalando estas proteínas como biomarcadores viables para su uso previo a un tratamiento de reproducción asistida.
2. HSPA2 y ARSA presentaran diferencias en sus patrones de unión dependiendo del tiempo de capacitación, indicando el tiempo óptimo de capacitación que necesita una muestra seminal para aumentar la tasa de éxito de los tratamientos de reproducción asistida.
3. Existe una correlación entre la expresión génica de HSPA2 y ARSA y la infertilidad masculina.

4. HSPA2 y ARSA son potenciales biomarcadores de la capacidad fecundante de los espermatozoides que podrán predecir la fertilidad masculina.

Esto lleva a plantearnos los siguientes objetivos, divididos por fases, que justifican la realización de esta memoria:

**Fase I:** Distribución de HSPA2 en espermatozoides humanos durante la capacitación *in vitro*.

*Human sperm chaperone HSPA2 distribution during in vitro capacitation*

1. Analizar la presencia y la ubicación espacial de HSPA2 en las células espermáticas humanas a 0, 1 y 4 horas de capacitación *in vitro*.

**Fase II:** Localización de Arilsulfatasa A durante la incubación *in vitro* de espermatozoides humanos en medio de capacitación.

*Localization of Arylsulfatase A during in vitro incubation of human spermatozoa in capacitation media.*

1. Evaluar la influencia del tiempo de capacitación en la distribución espacial del receptor ARSA, a 0, 1 y 4 horas de incubación en medio de capacitación.

2. Desarrollar un nuevo método fiable y sencillo para la localización y cuantificación de los receptores de proteínas en la superficie, utilizando el marcaje de *immunogold* en combinación con el FESEM.

**Fase III:** Selección de genes de referencia para estudios de expresión génica en espermatozoides humanos

*Reference gene selection for gene expression studies in human spermatozoa*

1. Valorar la idoneidad de 8 genes de referencia comúnmente utilizados para la normalización de la expresión de ARNm en espermatozoides.

**Fase IV:** Estudio de biomarcadores espermáticos en ratones y sus implicaciones en reproducción asistida.

*Study of sperm biomarkers in mice and the implications for assisted reproduction*

1. Detectar la presencia de la chaperona HSPA2 en espermatozoides de ratón y caracterizar su localización en la

cabeza de espermatozoides de ratón separados por su capacidad de unirse a la ZP.



## 4 RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

---

### 4.1 ANÁLISIS SEMINAL

Previamente al análisis de biomarcadores, todas las muestras seminales utilizadas fueron clasificadas como normozoospermicas según los valores de referencia de la OMS (World Health Organization, 2010) en el laboratorio de andrología del departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante (**Anexo I**).

### 4.2 EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA ESPONTÁNEA

Dada la importancia fisiológica de la capacidad del espermatozoide de liberar enzimas acrosomales durante la fecundación, el análisis de la integridad acrosomal de las células se realiza en nuestro laboratorio de forma rutinaria. De esta manera, se consideraron como no reaccionados aquellos espermatozoides que presentaban fluorescencia en la región acrosómica, mientras que los que presentaban el marcaje en la banda ecuatorial o no presentaban fluorescencia se consideraron como acrosómicamente reaccionados (Sáez-Espinosa et al., 2019) (**Anexo II, Figura 1A**). En todos los artículos incluidos en la presente tesis, publicados o no publicados, se observó la misma tendencia en la que no se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de células que reaccionaron

antes y después de una hora de capacitación, pero si después de cuatro horas (**Anexo II, Figura 1B**).

#### 4.3 FOSFORILACIÓN DE TIROSINAS

Un biomarcador de capacitación comúnmente usado en investigación es la presencia de tirosinas fosforiladas en el flagelo de los espermatozoides, ya que su correlación con el movimiento de hiperactivación hace de la fosforilación un proceso esencial para considerar que un espermatozoide es capaz de llegar hasta el ovocito. Los espermatozoides se clasificaron como fosforilados cuando presentaron una fluorescencia parcial o completa en su flagelo (Sáez-Espinosa et al., 2019) (**Anexo II, Figura 2A**). Como se detalla en cada uno de los artículos que forman parte de esta tesis, se encontró un aumento significativo de espermatozoides con tirosina fosforilada que además fue dependiente del tiempo de capacitación (**Anexo II, Figura 2B**).

#### 4.4 FASE 1: DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO A2 (HSPA2)

##### 4.4.1 Caracterización de patrones de distribución de HSPA2 en espermatozoides humanos

En los experimentos de inmunolocalización por fluorescencia de HSPA2 en espermatozoides humanos, se observó un aumento

significativo de células marcadas con HSPA2 tras cuatro horas de capacitación, pero no después de una hora.

Por otra parte, el análisis detallado de la distribución de HSPA2 en las células marcadas, permitió la identificación de tres patrones de distribución de esta proteína en la cabeza espermática: el patrón 1 (P1) mostraba una intensa fluorescencia en la región postacrosómica, el patrón 2 (P2) se expresaba en la banda ecuatorial y el patrón 3 (P3) que presentaba fluorescencia intensa en la región ecuatorial acompañado de un marcaje menos intenso pero homogéneo en toda la región acrosómica.

Antes de la capacitación, no se encontró ningún patrón predominante o característico de HSPA2. Por el contrario, una vez que los espermatozoides se sometieron a la capacitación *in vitro*, la mayoría de las células marcadas presentaban una intensa fluorescencia en la región ecuatorial acompañada de un marcaje menos intenso pero homogéneo en toda la región acrosómica (P3).

Asimismo, no se observaron diferencias significativas al comparar el porcentaje de células que presentaban P2 en los espermatozoides antes y después de una hora de capacitación. Sin embargo, este patrón fue significativamente mayor en células incubadas cuatro horas.

Por último, el patrón P1 no se observó en las células que habían capacitado durante una hora, pero sí estuvo presente en

células analizadas antes y tras cuatro horas de capacitación *in vitro*.

#### **4.4.2 Correlación entre biomarcadores**

El estudio simultaneo de diferentes biomarcadores nos permitió determinar que más del 66% de las células que presentaban HSPA2 distribuida en la banda ecuatorial y el acrosoma (P3) tenía además la membrana acrosomal intacta. Además, alrededor del 90% de las células que mostraban esta distribución de la chaperona presentaban a su vez fosforilación de tirosinas en su flagelo.

Por el contrario, alrededor del 90% de las células que concentraban HSPA2 en la banda ecuatorial habían sufrido además una reacción acrosómica espontánea. De manera similar, alrededor del 80% de las células que mostraban HSPA2 en la banda ecuatorial fueron positivas para fosforilación de tirosinas.

Finalmente, casi el 70% de las células que presentaba HSPA2 en la región postacrosomal estaba además acrosomalmente reaccionada, mientras que el 31% de las células sin capacitar mostraron de manera simultanea marcaje de HSPA2 en la región postacrosomal y fosforilación de tirosinas en su flagelo.

## **4.5 FASE 2: INMUNOLocalIZACIÓN DE ARILSULFATASA A (ARSA)**

### **4.5.1 Localización de ARSA en espermatozoides humanos mediante microscopía de fluorescencia**

La evaluación de ARSA en la superficie de la cabeza espermática utilizando inmunofluorescencia mostró diferencias significativas entre el porcentaje de células positivas para esta proteína antes y tras la capacitación, sin diferencias entre tiempos de capacitación. En las células con inmunofluorescencia para ARSA, se identificaron cuatro patrones principales de distribución de esta proteína: el patrón 1 (P1) se caracterizó por un marcaje en la banda ecuatorial y la zona periacrosomal; el patrón 2 (P2) mostró una fluorescencia tenue en la región acrosómica; el patrón 3 (P3) se expresó como una fluorescencia intensa en la región acrosomal y el patrón 4 (P4) mostró fluorescencia intensa en la región periacrosomal con un marcaje menos intenso pero homogéneo en toda la región acrosómica.

La comparación entre los estadios fisiológicos utilizados en esta tesis mostró como el porcentaje de P1 aumentaba con la capacitación, pero sin diferencias significativas entre los tiempos de incubación. De manera similar, P2 aumentó significativamente tras una hora de capacitación, disminuyendo de manera significativa tras cuatro horas de incubación. Independientemente del tiempo de incubación, la localización de

ARSA de manera intensa en la región acrosomal (P3) fue el patrón más representativo en las células capacitadas, mostrando diferencias significativas con respecto a las células analizadas antes de la incubación en condiciones de capacitación. Enfatizar que sólo en los espermatozoides capacitados se caracterizó un nuevo patrón, no observado en células en fresco, cuya localización fue en la zona periacrosomal (P4).

#### **4.5.2 Correlación entre biomarcadores**

El marcaje simultáneo de PNA y ARSA nos permitió determinar que, tras la capacitación, el 100% de las células que localizaron ARSA en la región periacrosomal y el acrosoma mantenían la membrana intacta. De manera similar, tan solo el 3% de las células que mostraron ARSA de manera intensa en la región acrosomal (P3) habían llevado a cabo la reacción acrosómica tras 4 horas de capacitación.

La integridad de la membrana acrosomal en aquellas células que localizaron ARSA de manera tenue fue disminuyendo con la capacitación, de manera que el 2% y el 20% de estas células habían sufrido una reacción acrosómica espontánea tras 1 y 4 horas de capacitación respectivamente. Esta misma tendencia se observó en aquellas células que presentaron ARSA en la banda ecuatorial y la zona periacrosomal, con un 7%, 12% y 22% de células reaccionadas antes y tras 1 y 4 horas de capacitación.

Por otro lado, el doble marcaje de ARSA y PY20 mostró como el 71,5% de las células que localizaron ARSA en la región periacrosomal y el acrosoma (P4) también había sido capaz de completar la fosforilación de tirosinas flagelares tras 4 horas de capacitación, mientras que en el caso de la subpoblación celular mostrando ARSA de manera intensa en el acrosoma, el 73,2% presentaron fosforilación de tirosinas tras 1 hora de capacitación, disminuyendo este porcentaje a las 4 horas de incubación *in vitro*.

#### **4.5.3 Localización de ARSA en espermatozoides humanos mediante FESEM**

Para mayor detalle, se realizó un inmunomarcaje con oro coloidal en combinación con la tecnología del FESEM. Al igual que en el análisis realizado mediante microscopía de fluorescencia, se observó un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides que presentaban ARSA en su superficie después de la capacitación *in vitro*, independientemente del tiempo.

Sin embargo, la precisión de esta técnica nos ha permitido cuantificar con exactitud los cambios de ARSA en la superficie de los espermatozoides. En este sentido, se han observado diferencias significativas en la densidad de partículas de oro en los diferentes dominios de la membrana de la cabeza del espermatozoide, de forma que los receptores de ARSA se

encuentran principalmente en la región acrosómica (94%-98%), encontrándose un 1%-6% de ARSA en la región postacrosomal.

Asimismo, poder cuantificar ARSA nos ha permitido determinar un aumento significativo de esta proteína en la región acrosomal de la cabeza espermática tras la capacitación, con diferencias significativas entre tiempos de incubación.

Adicionalmente, la posibilidad de mapear la superficie espermática ha permitido reafirmar que después de la capacitación *in vitro* existe una reubicación de los residuos de ARSA, ya que esta proteína se encontró distribuida de forma heterogénea por la superficie de la membrana acrosómica de la cabeza de los espermatozoides no capacitados pero agrupado en la región periacrosómica de las células capacitadas.

## 5 DISCUSIÓN GLOBAL

---

El complejo molecular estudiado en esta tesis, formado por SPAM1, HSPA2 y ARSA, es conocido por su implicación en el proceso de reconocimiento y unión de los gametos (Redgrove et al., 2013, 2012). Este hecho, unido a la incapacidad del gameto masculino para reconocer y adherirse a la ZP observada en numerosos casos de infertilidad masculina (E. Bromfield y otros, 2015; Liu y Baker, 2000; Nixon y otros, 2015; Redgrove y otros, 2012; Organización Mundial de la Salud, 2010) nos ha llevado a plantear el uso de HSPA2 y ARSA como posibles biomarcadores complementarios durante el clásico análisis seminal.

Antes de testar HSPA2 o ARSA y con el fin de evaluar las subpoblaciones espermáticas obtenidas, se valoró la fosforilación de tirosinas flagelares. El uso de la fosforilación de tirosinas como biomarcador de referencia para el estado de capacitación espermática es un recurso ampliamente utilizado (Florman and Fissore, 2014; Nassar et al., 1999; Sati et al., 2014). Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron un aumento de la fosforilación que además fue dependiente del tiempo de capacitación. Estos datos concuerdan con estudios anteriores (Nassar et al., 1999; Naz and Rajesh, 2004; Sati et al., 2014) y demuestran que los tiempos de capacitación utilizados

en este estudio fueron adecuados para la fosforilación de tirosina.

### 5.1 FASE 1: DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO A2 (HSPA2)

Durante la primera fase de esta tesis, y debido al papel de HSPA2 modulando la acción de ARSA y SPAM1, se pretendió estudiar la dinámica de HSPA2 durante la capacitación.

El alto porcentaje de células marcadas en la subpoblación espermática capacitada durante cuatro horas, en comparación con los grupos estudiados antes y tras una hora de capacitación, sigue la tendencia ilustrada en otros estudios (Motiei et al., 2013; Nixon et al., 2015). Sin embargo, estos estudios analizaron la presencia de HSPA2 en espermatozoides antes y tras tres horas de capacitación *in vitro*.

Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, las muestras seminales están formadas por múltiples subpoblaciones espermáticas que capacitan en diferentes tiempos de incubación (Ostermeier et al., 2018). Esto explicaría que la presencia de HSPA2 no muestre diferencias significativas después de una hora de capacitación, pequeñas diferencias después de tres horas (Motiei et al., 2013) y diferencias significativas después de cuatro horas de capacitación *in vitro*, coincidiendo además con el tiempo de incubación que tiene la mayor tasa de espermatozoides capaces de unirse a la ZP

(Baibakov et al., 2012). Esta tendencia se ha caracterizado anteriormente con diferentes biomarcadores, como el colesterol (Buffone et al., 2009), la fosforilación de proteínas (Buffone et al., 2004) o los glicoconjugados (Sáez-Espinosa et al., 2019).

En cuanto a la distribución espacial de HSPA2, a pesar de que antes de la capacitación no se observó ningún patrón mayoritario, la mayoría de las células que se recuperaron tras la incubación en medio capacitante presentaron marcaje en la banda ecuatorial y el acrosoma. Esta distribución ha sido similarmente descrita por otros autores (Bromfield et al., 2015; Huszar, 2003; Huszar et al., 1992; Liu and Baker, 2000; Motiei et al., 2013; Redgrove et al., 2013), sugiriendo su posible relación con una alta capacidad fecundante.

El hecho de que la presencia de este patrón de HSPA2 haya mostrado un aumento dependiente del tiempo indica que la chaperona requiere un tiempo de capacitación mayor de una hora para estar ubicado en la banda ecuatorial y la región acrosómica. Para apoyar aún más esta hipótesis, el doble marcaje de HSPA2 y fosforilación de tirosinas permitió determinar que, tras la capacitación, alrededor del 90% de las células que mostraban P3 presentaron a su vez tirosinas fosforiladas en su flagelo, subrayando la importancia fisiológica de esta subpoblación.

Por otra parte, el marcaje simultáneo de HSPA2 y la lectina PSA nos permitió correlacionar la presencia de la chaperona en la banda ecuatorial con aquellas células que habían completado la reacción acrosómica. A este respecto, existen estudios realizados con otras proteínas implicadas en la fusión de los gametos que se reubican hacia la banda ecuatorial durante la reacción acrosómica, con el fin de realizar su función tras la eliminación de la membrana acrosomal externa (Flesch and Gadella, 2000; Okabe, 2014; P. Sáez-Espinosa et al., 2018; Satouh et al., 2012) (Gadella, 2008).

En base a los resultados descritos en esta parte de la tesis, podríamos deducir que cuando se permite a los espermatozoides capacitar durante más tiempo, el número de células con marcaje para HSPA2 aumenta, a la vez que la subpoblación espermática capaz de localizar esta proteína en la región de interacción con el ovocito. La distribución de la HSPA2 en la banda ecuatorial y el acrosoma en las células capacitadas podría ser lo que permita que el complejo proteínico ARSA, HSPA2 y SPAM1 se localice temporal y espacialmente para desempeñar su función en la interacción entre gametos (E. G. Bromfield y otros, 2015a, 2015b; Nixon y otros, 2015; Redgrove y otros, 2013, 2011).

## 5.2 FASE 2: INMUNOLocalización de ARILSulfatasa A (ARSA)

Una vez analizada la dinámica de HSPA2, el estudio de la localización de ARSA durante la capacitación fue nuestro objetivo debido al papel de esta proteína como receptor de ZP durante el proceso de fecundación.

A diferencia de lo ocurrido con HSPA2, al evaluar la presencia de ARSA por microscopía de fluorescencia, pudimos observar un aumento significativo del porcentaje de células positivas para esta proteína tras la capacitación, independientemente del tiempo de incubación. Estos resultados concuerdan con estudios previos <sup>27,29</sup> y nos llevan a sugerir que la importancia de ARSA durante las primeras fases de la fecundación es lo que provocaría que su máxima presencia se mantenga desde las primeras fases de la capacitación.

De manera similar a lo ocurrido con HSPA2, la subpoblación espermática recuperada tras la capacitación fue más homogénea con respecto a la distribución espacial de ARSA. Independientemente del tiempo de incubación, el patrón más observado fue el marcaje en la región **acrosomal**.

**Así mismo, también fue observado un patrón de distribución con ARSA concentrado en la banda ecuatorial, que fue igualmente correlacionado con aquellas células que habían perdido la integridad de su membrana acrosomal.**

A pesar de que no fue el patrón más representativo en ninguna de las poblaciones estudiadas, es destacable que un porcentaje de células presentó una distribución de ARSA en la región periacrosomal de la cabeza espermática. Es lógico asociar esta localización con el reconocimiento primario de los gametos, ya que la zona periacrosomal de la cabeza del espermatozoide es la primera en entrar en contacto con el ovocito durante las primeras fases de la fecundación<sup>37</sup>. Además, otros autores han descrito la colocalización de esta proteína con la chaperona HSPA2 en esta región<sup>27,29</sup>.

Tras observar que el porcentaje de células espermáticas presentando esta distribución no solo no estaba presente en las células previas a la capacitación sino que además aumentó de manera dependiente al tiempo de incubación, se decidió estudiar ARSA utilizando la técnica del FESEM, ya que es un tipo de microscopía considerablemente mejorada y con una resolución comparable en resolución al Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM);(Apkarian, 1997).

En primer lugar, se observó la misma tendencia en cuanto al porcentaje de células positivas, con una mayor subpoblación tras la capacitación, pero sin diferencias entre los tiempos de incubación. La diferencia radicó en que, a pesar de seguir la misma tendencia, el porcentaje de células positivas de todos los grupos fue significativamente mayor en el estudio realizado con

FESEM que en el estudio por inmunofluorescencia. Esta discrepancia podría deberse a la mayor sensibilidad y resolución que presenta el FESEM frente a un análisis por fluorescencia.

Por otra parte, gracias a la combinación del marcaje con partículas de oro y la alta resolución del FESEM, pudimos cuantificar con precisión el aumento en la densidad de ARSA en la cabeza del espermatozoide durante la capacitación *in vitro*.

Este aumento, al contrario que en el estudio hecho con fluorescencia, sí que mostró diferencias significativas entre los dos tiempos de capacitación utilizados a lo largo de esta tesis. Estos resultados indican que, a pesar de que a tiempos cortos de capacitación ya hay una gran subpoblación espermática que presenta ARSA en su superficie, estas células necesitan un tiempo más largo de incubación en condiciones capacitantes para aumentar la cantidad de proteína que presentan en su superficie, lo que facilitaría que ARSA cumpliera su papel durante el reconocimiento primario de gametos (Bromfield y otros, 2015; Redgrove y otros, 2013; pendiente de publicación: ANDROL-D-20-00012R1).

Asimismo, el uso del FESEM en este trabajo ha permitido la detección de ARSA en la región postacrosomal de la cabeza espermática. Cabe destacar que la diferencia de densidad de esta proteína entre los dominios que conforman la membrana de la cabeza espermática no se había descrito anteriormente. Este

hecho pone de manifiesto, de nuevo, la alta sensibilidad de la técnica y su importancia en futuras aportaciones a la biología molecular del espermatozoide. Como se ha descrito previamente, el reconocimiento secundario del ovocito tiene lugar a través de las proteínas encontradas en la región postacrosomal, lo que sugiere un posible papel de ARSA en este proceso.

Asimismo, el mapeo de las partículas de oro en la superficie de la cabeza espermática mostró una reubicación de los residuos de ARSA tras la capacitación *in vitro* hacia la región periacrosomal. Esta reubicación, sumado al aumento de densidad de ARSA durante la capacitación están en consonancia con los resultados obtenidos en el estudio mediante fluorescencia y con la relación señalada por otros autores (Nixon y otros, 2015; Redgrove y otros, 2013) entre la localización del complejo proteínico ARSA/HSPA2/SPAM1 en la región periacrosómica de los espermatozoides capacitados con una alta capacidad fecundante.

## II. TRABAJOS PUBLICADOS O ACEPTADOS

---



## 1 TRABAJOS PUBLICADOS. FASE I

---

### 1.1 **CAPÍTULO 1: DISTRIBUCIÓN DE LA CHAPERONA HSPA2 EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS DURANTE LA CAPACITACIÓN *IN VITRO***

*Human sperm chaperone HSPA2 distribution during in vitro capacitation.* Journal of reproductive immunology. 2021 Feb; 143. Doi: 10.1016/j.jri.2020.103246. Esta revista se encuentra clasificada, según el JCR Science Edition, en una posición Q1 (4/29) en la categoría científica *Reproductive Biology*. Esta revista tiene un índice de impacto de 4.018.



## 2 TRABAJOS PUBLICADOS. FASE II

---

### 2.1 CAPÍTULO 1: LOCALIZACIÓN DE ARILSULFATASA A DURANTE LA INCUBACIÓN *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS EN MEDIO DE CAPACITACIÓN.

*Localization of arylsulfatase A during in vitro incubation of human spermatozoa in capacitation media.* Revista Internacional de Andrología. 2021 Feb; 143. Doi: 10.1016/j.jri.2020.103246. Esta revista se encuentra clasificada, según el JCR Science Edition, en una posición Q4 (8/8) en la categoría científica *Andrlogy*. Esta revista tiene un índice de impacto de 0.635.



## 2.2 **CAPÍTULO 2: LOCALIZACIÓN DE ARILSULFATASA A MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISIÓN DE CAMPO DE ALTA (FESEM) EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.**

*Arylsulfatase a location by high-resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM) on human sperm.*

Revista Internacional de Andrología. 2021 Feb; 143. Doi: 10.1016/j.jri.2020.103246. Esta revista se encuentra clasificada, según el JCR Science Edition, en una posición Q4 (8/8) en la categoría científica *Andrlogy*. Esta revista tiene un índice de impacto de 0.635.



### III. OTROS TRABAJOS

---



### 1.1 INTRODUCCIÓN

Los estudios referentes a HSPA2 en ratón se han centrado en su función durante el proceso espermatogénico (Dix et al., 1996). Las funciones que se han atribuido a esta proteína van desde la mediación la progresión del ciclo celular mitótico y la modulación del complejo sinaptonemal en los eventos de recombinación meiótica (Dix et al., 1997; Zhu, Dix y Eddy, 1997), hasta la compactación nuclear durante la espermiogénesis (Govin et al., 2006; Liu et al., 2007). Tal es su importancia en el potencial reproductivo que la delección selectiva del gen HSPA2, produce un fenotipo de infertilidad debido a la detención de los espermatocitos en meiosis I y un aumento de la apoptosis celular.

La implicación de esta proteína en el desarrollo de células germinales masculinas, así como su participación en el potencial de fertilidad queda evidenciado por la bibliografía mencionada anteriormente, y hacen de esta proteína una candidata prometedora para su uso como biomarcador espermático.

## 1.2 MATERIAL Y MÉTODOS

## 1.3 RESULTADOS

### 1.3.1 Evaluación de la reacción acrosómica espontánea

La integridad de la membrana acrosomal es un biomarcador ampliamente utilizado de manera rutinaria durante el estudio de las células espermáticas de ratón debido a la importancia fisiológica de este proceso durante la fecundación (REF).

En lo que refiere a la valoración de la reacción acrosómica en ratón, el marcaje con PNA permite observar la progresión del proceso de exocitosis acrosómica, de manera que aquellas células que aún no han liberado su contenido acrosomal, presentan un marcaje intenso en esta región (P1). Una vez la reacción es inducida por las células del cúmulo, la lectina se puede seguir observando en la región acrosomal durante la fase inicial del proceso, pero esta vez acompañada de un marcaje más tenue en el segmento ecuatorial (P2). A medida que la reacción progresa, la intensidad disminuye en el acrosoma (P3) hasta que, finalmente, la fluorescencia desaparece por completo (P4). La frecuencia de estos patrones en los dos grupos experimentales (células unidas y no unidas a ZP) se pueden consultar en la figura 3A del anexo III.

De manera resumida, se observó un porcentaje de espermatozoides reaccionados significativamente superior en el

grupo de células que fue capaz de unirse a la ZP (99,80%) que entre los espermatozoides que no se unieron a ella (38,10%). Además, el 60,28% de las células que habían conseguido unirse a la ZP presentaron una reacción acrosómica completa (P4), mientras que entre las células reaccionadas que no se unieron a la ZP, el patrón mayoritario fue P3, característico de una reacción acrosómica avanzada pero incompleta.

### **1.3.2 Fosforilación de tirosinas**

Debido a su importancia en el proceso de capacitación, a lo largo de esta tesis se ha valorado la presencia de tirosinas fosforiladas en el flagelo espermático de todas las subpoblaciones estudiadas. Al igual que en las muestras de donantes humanos, los espermatozoides se clasificaron como fosforilados cuando presentaron una fluorescencia parcial o completa en su flagelo (Sáez-Espinosa et al., 2019) (**Anexo III, Figura 3B**).

En este caso, se observó un porcentaje de células fluorescentes significativamente mayor en el grupo de espermatozoides que llegaron a unirse a la ZP de ratón (89,26%) que en la población que no se unió (64,35%) (**Anexo III, Figura 3B**).

### **1.3.3 Caracterización de patrones de distribución de HSPA2 en espermatozoides de ratón**

En lo referente a la presencia de HSPA2 en espermatozoides de ratón, se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de células que presentaban HSPA2 en grupo de espermatozoides que se unió a la ZP y el grupo de no unidos. De aquellos espermatozoides que no fueron capaces de adherirse a la ZP, el 85,5% presentó HSPA2 en su superficie, mientras que el 96,1% de células del grupo de unidos fue positivo para esta proteína.

Por otro lado, tras analizar en detalle la distribución de HSPA2 en las células positivas, se describieron un total de 5 patrones de distribución en la cabeza espermática (**Anexo III, Figura 4A**). El primer patrón (P1) se caracterizó por una intensa fluorescencia en el tercio superior del acrosoma y el segmento ecuatorial; el patrón 2 (P2) presentó la fluorescencia concentrada en la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide; el patrón 3 (P3) mostró una clara fluorescencia en la región ventral del segmento ecuatorial; en el cuarto patrón (P4) se pudo distinguir un marcaje tenue en el segmento ecuatorial acompañada de una fluorescencia intensa en el acrosoma, mientras que en el patrón 5 (P5) se observó fluorescencia en el segmento posterior del acrosoma y la región ventral.

Tras estudiar la distribución de HSPA2 en células que no se unieron a la ZP, encontramos una población heterogénea con

mucha presencia de los patrones P1, P4 y P5 (28,7%, 25,1% y 19,3% respectivamente). Por el contrario, la determinación de la distribución de HSPA2 en células unidas a la ZP, mostró una población más homogénea, siendo los patrones mayoritarios P2 y P5 (33% y 34,5%) mientras que P1 pasó a ser el minoritario con un 3,6% de células (**Anexo III, Figura 4B**).

#### **1.3.4 Correlación entre biomarcadores**

Con el fin de correlacionar los diferentes patrones de HSPA2 con el estado acrosomal de la célula, así como con la fosforilación de tirosinas, se realizó un triple marcaje. Este análisis nos permitió discernir que un 22,56% de las células que no habían sido capaces de unirse a la ZP presentaban fosforilación de tirosinas en su flagelo además de presentar marcaje para PNA. Dentro de esta población, la mayoría de células mostraron una distribución de HSPA2 en el tercio superior del acrosoma y el segmento ecuatorial (P1; 29,1%) o en el segmento ecuatorial y el acrosoma (P4; 28,3%).

Por otra parte, se observó que el 89% de las células que se recuperaron tras su unión con la ZP presentaron tirosinas fosforiladas en su flagelo y un acrosoma reaccionado. Los patrones de HSPA2 significativamente mayoritarios en esta subpoblación espermática fueron P2 y P5, con un 35,2% y 35,3% respectivamente.

## 1.4 **DISCUSIÓN**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

En los últimos años se ha intentado identificar cualquier correlación entre el perfil de RNA espermático y la infertilidad masculina, llegando a demostrar que algunas de estas moléculas de RNA específicas de espermatozoides desempeñan un papel fundamental en la motilidad espermática, la capacitación y reacción acrosómica (Jodar et al., 2015; Wang et al., 2004). Sin embargo, para la correcta medición de los niveles de expresión mediante RT-qPCR, es necesario un control interno estable mediante el uso de genes HK (Ginzinger, 2002).

Los pocos estudios disponibles sobre posibles genes HK en muestras espermáticas (Amoako et al., 2013; Barragán et al., 2015; Suzuki et al., 2000; Thellin et al., 1999) carecen de la validación de los genes testados en diferentes condiciones (Robinson et al., 2007; Vandesompele et al., 2002), por lo que hasta ahora se han utilizado genes HK de probada utilidad en otros tejidos biológicos (Eisenberg and Levanon, 2003).

### **2.2 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.3 RESULTADOS**

#### **2.3.1 Análisis seminal**

Previamente al análisis de biomarcadores, todas las muestras seminales utilizadas fueron clasificadas según los valores de referencia de la OMS (World Health Organization, 2010). Así, para abarcar el mayor número posible de variables, se incluyeron 20 donantes normozoospermicos, 5 astenozoospermicos, 5 teratozoospermicos, 5 oligozoospermicos y 5 oligoastenoteratozoospermicos. Estas muestras fueron facilitadas por el laboratorio de andrología de la clínica de fertilidad IVF-Spain (**Anexo I**).

### **2.3.2 Genes de referencia (HK) para muestras seminales**

## **2.4 DISCUSIÓN**



## **IV. CONCLUSIONES**

---



La chaperona HSPA2 puede ser un buen biomarcador de la capacitación y la madurez del esperma, ya que los espermatozoides que, tras la capacitación, no logren localizar correctamente esta proteína, no podrán presentar ARSA ni SPAM 1, ambos implicados en la interacción de los espermatozoides con el ovocito (Bromfield, Aitken, Anderson et al, 2015; Bromfield, McLaughlin y otros, 2015; Nixon y otros, 2015; Redgrove y otros, 2013).

La necesidad de un tiempo más largo que la hora sugerida por las directrices de la OMS para la capacitación por *swim-up*. Se necesitan al menos cuatro horas para la remodelación óptima asociada a la capacitación de la membrana plasmática de los espermatozoides, que podría incluir modificaciones post-traducción de la HSPA2 que podrían estar descubriendo los epítomos de la HSPA2, lo que daría lugar a las diferentes ubicaciones de los chaperones observadas en este estudio.

Sobre la base de nuestros resultados, se podría concluir que la remodelación de la membrana plasmática asociada a la capacitación podría incluir modificaciones post-traducción del HSPA2. Además, se requerirían al menos cuatro horas de incubación en medios capacitantes para una óptima localización de HSPA2 en la membrana plasmática de los espermatozoides. Esto nos lleva a proponer que algunos de los cambios fisiológicos de los espermatozoides asociados a la capacitación, como la remodelación de la membrana plasmática y la fosforilación de la tirosina, necesitan un tiempo mayor que la hora sugerida por las directrices de la OMS para alcanzar los valores ideales.

Por otra parte, podríamos sugerir que la presencia de HSPA2 en la banda ecuatorial y la región acrosómica después de la capacitación podría ser esencial para desempeñar su papel en la interacción esperma-ocito. Por lo tanto, al aumentar el tiempo de

incubación a cuatro horas en condiciones de capacitación, deberíamos ser capaces de recuperar una mayor subpoblación de espermatozoides que han sido capaces de mostrar y localizar esta proteína en la región de interacción ovocitaria.

En vista de estos factores, el chaperón HSPA2 podría proponerse como un buen biomarcador de capacitación y madurez.

A partir de los resultados presentados en este estudio, se podría deducir que cuando los espermatozoides se incuban con medio de capacitación, independientemente del tiempo, aumenta de manera significativa el número de células con inmunomarcaje para ARSA. De igual manera, se observa una tendencia al alza del porcentaje de espermatozoides con una distribución de ARSA a nivel de la zona de interacción con el ovocito tras ambos tiempos de incubación. La presencia de ARSA en la región acrosomal y/o periacrosomal de las células incubadas podría significar que esta proteína desempeñase un papel en el reconocimiento primario del ovocito, siguiendo el modelo propuesto por Redgrove<sup>26,27,29,32</sup>.

Estos resultados nos llevan a sugerir que ARSA, propuesta por diferentes autores<sup>27,29,30</sup> como proteína de reconocimiento de ZP, podría ser un biomarcador de capacitación y madurez espermática, ya que los espermatozoides que, tras la incubación en medio de capacitación, no presenten esta proteína en la región acrosomal y periacrosomal, no podrán interactuar correctamente con el ovocito<sup>25,26,27,29,32</sup>. No obstante, a pesar de la evidente tendencia y de la utilidad que ha demostrado la incubación en medio capacitante durante cuatro horas con otros

biomarcadores<sup>6,7,22,23,34,40</sup>, para poder recomendar dichos tiempos de incubación a la práctica clínica, es necesario seguir ampliando el conocimiento sobre estos eventos moleculares. En este sentido futuros estudios serán realizados con muestras seminales de pacientes sometidos a técnicas de reproducción asistida, para conocer el papel de este receptor en la capacidad fecundante de los espermatozoides, teniendo en cuenta parámetros adicionales como la fragmentación del ADN, la capacidad de unión al ácido hialurónico o la hiperactivación espermática<sup>38,39</sup>.

In conclusion, our study demonstrates that the FESEM-immunogold labelling technique allows the accurate quantification and localization of ARSA on the sperm plasma membrane. Furthermore, it illustrates the relevance of FESEM technique for the simultaneous study of sperm biomarkers and the structural changes that the sperm undergoes during the capacitation process, establishing a new tool to improve cell surface study for a better understanding of sperm biology. Moreover, this quantitative and topographic approach has shown that the density changes of ARSA on the spermatozoa membrane surface are capacitation-dependent. Therefore, FESEM-immunogold labelling is a valuable technique to be considered when conducting studies that lead to a further understanding of the plasma membrane as long as the molecular basics of human sperm capacitation.