

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA INCUBACIÓN DE ESPERMA A ALTA TEMPERATURA  
SOBRE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN.**

**Por**

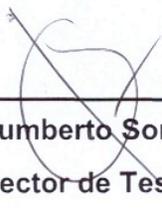
**DR. MARCO DAVID DEL CUETO AGUILERA**

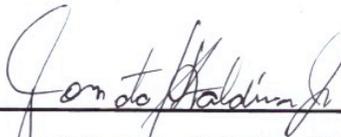
**Como requisito para obtener el Grado de  
SUBESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN  
HUMANA**

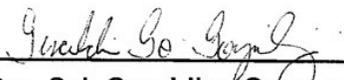
**Febrero, 2021**

**EFFECTO DE LA INCUBACIÓN DE ESPERMA A ALTA TEMPERATURA  
SOBRE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN**

**Aprobación de la tesis:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. med. Luis Humberto Sordia Hernández**  
**Director de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. med. Donato Saldívar Rodríguez**  
**Jefe del Departamento de Ginecología y Obstetricia**



---

**Dra. Sci. Geraldina Guerrero González**

**Coordinadora de Investigación**

**Departamento de Ginecología y Obstetricia**



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**

**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## **DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS**

Con todo mi cariño y mi amor para mis padres Angel Noé del Cueto Morales (QEPD) y Ana Margarita Aguilera Morán quienes son las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano en todo momento, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mi esposa Jessica Esquivel que gracias a su amor, apoyo y paciencia obtenemos un logro profesional más.

A mis hermanos Angel Noé y Anecy Margarita por todo su cariño y apoyo en los momentos más importantes de mi vida.

A mis maestros que, en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos de la vida, especialmente al Dr. Luis Humberto Sordia Hernández director de mi tesis por su confianza y gran apoyo en este proyecto, así como también a la Dra.C. Selene García que sin su participación en el proyecto no hubiera sido posible realizarlo.

A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

A Dios quien me ha permitido llegar hasta este momento.

# TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>Capítulo I</b>	
<b>1. RESUMEN. . . . .</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo II</b>	
<b>2. INTRODUCCIÓN. . . . .</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Infertilidad . . . . .</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Técnicas de Reproducción Asistida . . . . .</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Fecundación . . . . .</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Capacitación Espermática . . . . .</b>	<b>7</b>
<b>2.5 Calcio Intracitoplasmático . . . . .</b>	<b>8</b>
<b>2.6 Fragmentación del ADN Espermático . . . . .</b>	<b>10</b>
<b>2.7 Pregunta de Investigación . . . . .</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo III</b>	
<b>3. HIPÓTESIS. . . . .</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Hipótesis nula. . . . .</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Hipótesis alterna . . . . .</b>	<b>14</b>

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>Capítulo IV</b>	
<b>4. OBJETIVOS. . . . .</b>	<b>.15</b>
<b>Capítulo V</b>	
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS. . . . .</b>	<b>.16</b>
<b>5.1 Análisis estadístico. . . . .</b>	<b>.20</b>
<b>5.2 Tamaño de muestra. . . . .</b>	<b>.21</b>
<b>5.3 Aprobación del comité de ética. . . . .</b>	<b>.21</b>
<b>Capítulo VI</b>	
<b>6. RESULTADOS. . . . .</b>	<b>.22</b>
<b>6.1 Características de las pacientes. . . . .</b>	<b>.22</b>
<b>6.2 Comparación de los parámetros de hipermotilidad             espermática . . . . .</b>	<b>.27</b>
<b>Capítulo VII</b>	
<b>7. DISCUSIÓN. . . . .</b>	<b>.33</b>
<b>Capítulo VIII</b>	
<b>8. CONCLUSIÓN. . . . .</b>	<b>.39</b>

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>Capítulo IX</b>	
<b>9. BIBLIOGRAFÍA. . . . .</b>	<b>40</b>
<b>Capítulo X</b>	
<b>10. RESUMEN AUTOBIBOGRÁFICO. . . . .</b>	<b>44</b>
<b>Capítulo XI</b>	
<b>11. SUMMARY. . . . .</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo XII</b>	
<b>12. ANEXOS . . . . .</b>	<b>48</b>
<b>12.1 Aprobación del Comité de Ética en Investigación . . .</b>	<b>48</b>
<b>12.2 Aprobación del Comité de Investigación . . . . .</b>	<b>49</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>1. Descripción de participantes</b>	<b>22</b>
<b>2. Descripción inicial de los parámetros espermáticos de las muestras incluidas en este estudio.</b>	<b>23</b>
<b>3. Comparación de las concentraciones inicial y post incubación de espermatozoides totales, móviles y progresivos.</b>	<b>25</b>
<b>4. Comparación de las concentraciones post incubación de espermatozoides totales, móviles y progresivos.</b>	<b>26</b>
<b>5. Comparación de las concentraciones post incubación de espermatozoides clasificados según su velocidad por el sistema CASA.</b>	<b>28</b>
<b>6. Comparación de los parámetros de motilidad post - incubación.</b>	<b>31</b>
<b>7. Número de espermatozoides con ADN fragmentado o ADN no-fragmentado a las diferentes temperaturas de incubación.</b>	<b>32</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>1. Concentraciones inicial y post incubación de espermatozoides totales, móviles y progresivos.</b>	<b>24</b>
<b>2. Velocidad espermática inicial y post capacitación.</b>	<b>27</b>
<b>3. QQ plot de los parámetros de motilidad espermática obtenidos mediante el CASA.</b>	<b>29</b>
<b>4. Comparación de los parámetros de motilidad espermática post incubación a 37 y 40 °C.</b>	<b>30</b>
<b>5. Esquema de los parámetros de motilidad medidos por CASA.</b>	<b>35</b>

## ABREVIACIONES

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALH</b>	Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza
<b>ALH</b>	Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>AOT</b>	Prueba de Naranja de Acridina
<b>BCF</b>	Frecuencia de cruzamientos
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CASA</b>	Análisis de espermatozoides asistido por computadora
<b>COMET</b>	Ensayo de electroforesis en gel de una sola célula
<b>EA</b>	Exocitosis acrosomal
<b>FIV</b>	Fertilización In Vitro
<b>HCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato
<b>ICSI</b>	Inyección intracitoplasmática del espermatozoide
<b>IUI</b>	Inseminación Intrauterina
<b>LIN</b>	Índice de linealidad
<b>pH</b>	Potencial de Hidrogeniones
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>RCF</b>	Fuerza centrífuga relativa
<b>SCD</b>	Prueba de dispersión de la cromatina espermática
<b>SCSA</b>	Análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide
<b>SDF</b>	Porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>STR</b>	Rectitud
<b>TRA</b>	Técnicas de Reproducción Asistida
<b>TUNEL</b>	Marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa
<b>VAP</b>	Velocidad de trayectoria media
<b>VCL</b>	Velocidad Curvilínea
<b>VSL</b>	Velocidad de línea recta

## **CAPITULO I:**

### **1. RESUMEN**

#### **Introducción**

La infertilidad se define como la falla de una pareja para concebir posterior a 12 meses de relaciones sexuales sin el uso de anticoncepción en mujeres menores de 35 años y posterior a 6 meses en mujeres mayores de 35 años <sup>1</sup>.

El principal tratamiento consiste en la utilización de técnicas de reproducción asistida (TRA). Sin embargo, las tasas de éxito de las TRA son del 30%, por lo que no son consideradas de alta eficacia <sup>1</sup>. Por lo que teniendo en cuenta la baja efectividad de los tratamientos y su creciente demanda, es fundamental mejorar los tratamientos existentes, incluyendo innovaciones que ayuden a mejorar su rendimiento <sup>2</sup>.

#### **Objetivos**

1. Comparar el efecto que tiene la incubación de espermatozoides a temperatura elevada (40 °C) y la incubación en temperatura fisiológica (37 °C) en los parámetros de motilidad espermática.
2. Evaluar si la temperatura de incubación a la que se somete la muestra de esperma (37 °C y 40 °C) afecta la tasa de fragmentación del ADN espermático.

## **Material y métodos**

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo y no aleatorizado, piloto. El estudio incluyó pacientes masculinos con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León durante el 2020 y que se sometieron a técnicas de reproducción asistida de alta complejidad, incluyendo fertilización in vitro (FIV) e inyección citoplasmática del esperma (ICSI).

La hiperactivación espermática se evaluó mediante el sistema de análisis de esperma asistido por computadora (CASA) con énfasis en los valores de velocidad curvilínea (VCL), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y linealidad (LIN) que reflejan la motilidad hiperactivada. La fragmentación del ADN espermático se realizó después de incubación espermática a 37 °C y 40 °C, con el kit diagnóstico in vitro Halosperm (HalotechDNA, España).

## **Resultados**

No se encontraron diferencias entre concentración de espermias totales, móviles y progresivos respecto a temperatura de incubación. Hubo una diferencia estadísticamente significativa en la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado con respecto a la temperatura de incubación.

## **Conclusiones**

La incubación post- capacitación de espermias, a una temperatura de 40 °C, no causó hiperactivación espermática. Adicionalmente, se observó diferencia en la fragmentación de ADN espermático entre los espermias incubados a 37°C y 40°C.

## **Palabras Clave:**

Temperatura, Hiperactivación espermática, Fragmentación del ADN, CASA.

## CAPITULO II:

### 2. INTRODUCCION

#### 2.1 INFERTILIDAD

La infertilidad se define como la falla de una pareja para concebir posterior a 12 meses de relaciones sexuales sin el uso de anticoncepción en mujeres menores de 35 años y posterior a 6 meses en mujeres mayores de 35 años <sup>1</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la infertilidad afecta a 48 millones de parejas y 186 millones de individuos a nivel mundial <sup>3</sup>. Dado que las consultas por infertilidad se han incrementado en los últimos años, la infertilidad se puede considerar un problema creciente de salud pública, ocasionando en aquellos que la padecen estrés físico, emocional y social <sup>4</sup>.

En México, se estima que entre 4 y 5 millones de parejas padecen infertilidad <sup>5</sup>. En 2013, la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (RedLara) reportó que en México se llevaron a cabo más de 7,000 ciclos de preparación para técnicas de reproducción asistida <sup>6</sup>. En el país se documentó el primer embarazo logrado a través del uso de las tecnologías de reproducción asistida y el uso de donación de óvulos en Monterrey, N.L. en 1987 mientras que en 1988, el primer bebé concebido mediante fertilización *in vitro* (IVF) fue reportado en la Ciudad de México <sup>6</sup>.

La reproducción asistida en México ha tenido influencia de los Estados Unidos y España mediante el entrenamiento de los médicos y biólogos en clínicas de dichos países.

El tratamiento de la infertilidad consiste en la utilización de técnicas de reproducción asistida (TRA) para lograr el embarazo. Desde el nacimiento del primer bebé en tubo de ensayo, Louise Joy Brown, en Julio 25 de 1978 <sup>7</sup>, se estima que al menos 5 millones de niños han nacido mediante el uso de estas técnicas <sup>8</sup>. En los Estados Unidos, el uso de TRA se duplicó en la última década, estimando que aproximadamente el 1.7% de los niños nacidos son concebidos mediante su uso. En 2017, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), reportó 78,052 nacidos vivos de 284,385 ciclos de TRA, lo que correspondió a un 27% de éxito <sup>9</sup>.

## 2.2 TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA)

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) comprenden la manipulación de gametos o embriones in vitro con el objetivo de lograr un embarazo <sup>10</sup>.

Entre las más conocidas se incluyen: la inseminación en sus variantes y la fecundación in vitro, la crioconservación de gametos y embriones, la obtención de espermatozoides y óvulos mediante donación, el diagnóstico preimplantacional, la selección de ovocitos y la gestación subrogada <sup>11</sup>.

Es importante destacar que las tasas de éxito de las TRA disponibles actualmente se aproximan en conjunto al 30%, por lo que no son consideradas de alta eficacia <sup>1</sup>. Teniendo en cuenta la relativa baja efectividad en los tratamientos, aunado a

la creciente demanda, es importante la mejora de los tratamientos existentes, posibilitando a la vez innovaciones que ayuden a mejorar su rendimiento <sup>2</sup>. Las técnicas de reproducción asistida pueden dividirse en baja y alta complejidad basado en si la unión del óvulo y espermatozoide ocurre dentro o fuera del cuerpo de la mujer, respectivamente. En las TRA de baja complejidad, la unión entre óvulo y espermatozoide se realiza dentro de la trompa de Falopio y de alta complejidad dicha unión ocurre en el laboratorio, por lo que los óvulos son extraídos. En cuanto a las técnicas de baja complejidad, se utiliza casi exclusivamente la inseminación intrauterina (IIU). Mientras que las técnicas de alta complejidad más utilizadas en la actualidad son la denominada ICSI (Inyección Intracitoplasmática del Espermatozoide) y FIV (Fertilización *in vitro*). Si bien la efectividad de los métodos de alta complejidad es mayor que la de los métodos de baja complejidad, los elevados costos dificultan el acceso para la mayoría de los pacientes. Asimismo, los métodos de alta complejidad tienen numerosas desventajas a nivel técnico ya que requieren un complejo equipamiento, con infraestructura y personal calificado. Esto no es necesario en los procedimientos de menor complejidad. No menos importante resulta el hecho de que las técnicas de alta complejidad evitan todas las barreras naturales presentes en el proceso natural de fecundación que deben ser normalmente superadas por el espermatozoide, cumpliendo esto un rol de selección natural.

### 2.3 FECUNDACIÓN

La fecundación es un proceso biológico en el cual el óvulo y el espermatozoide se deben reconocer y fusionar para formar un cigoto <sup>12</sup>.

Los espermatozoides eyaculados ingresan en el tracto reproductor de la mujer y, a través de un proceso de selección, ascienden y forman un reservorio en la trompa uterina.

Es durante su paso por el tracto femenino que los espermatozoides de mamífero adquieren capacidad fecundante en un proceso denominado capacitación espermática <sup>2,13</sup>.

### 2.4 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Durante el proceso de capacitación espermática, el espermatozoide adquiere dos propiedades fundamentales: la motilidad hiperactivada, <sup>14</sup> la cual es esencial para poder migrar a través del oviducto y penetrar las distintas capas celulares y acelulares que rodean al ovocito y la capacidad de realizar exocitosis acrosomal (EA) donde ante el estímulo adecuado la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del ovocito se fusionan en múltiples puntos, produciéndose la liberación y dispersión de los contenidos acrosomales <sup>15</sup>.

Para que el espermatozoide pueda adquirir estas dos capacidades, deben producirse numerosos cambios moleculares incluyendo cambios de pH, movimientos de iones, activación de vías de señalización (en particular la vía AMPc/PKA), cambios en el citoesqueleto e hiperpolarización de membrana. Si bien no está claro cuál es el momento preciso que da comienzo a los eventos

relacionados con la capacitación, se considera que, al entrar al tracto reproductor femenino, se produce una salida de colesterol de la membrana plasmática y una entrada de  $\text{HCO}_3^-$  que activa la adenilato ciclasa soluble. Esto produce un aumento de AMPc y una activación de PKA (proteína quinasa A), lo cual se traduce en un aumento importante en el número de proteínas fosforiladas por esta quinasa. Además, la activación de PKA resulta en un aumento en la fosforilación de proteínas en tirosina, el cual es uno de los eventos mejor caracterizados en espermatozoides de mamíferos <sup>16</sup>. A nivel de la membrana plasmática, la salida de colesterol y el reordenamiento de ciertos lípidos producen un aumento en la fluidez de membrana. Además, se observa que el espermatozoide se hiperpolariza durante la capacitación, evento en el cual el canal de potasio específico de espermatozoides SLO3 juega un rol fundamental <sup>17,18</sup>. Este cambio en el potencial es indispensable para que el espermatozoide pueda realizar la EA. Otro fenómeno que acompaña al proceso de capacitación es el aumento del pH citoplasmático mediado principalmente por los canales H1V y NHE <sup>19,20</sup>. Esta alcalinización del citoplasma es fundamental para que se pueda activar CatSper, el principal canal de  $\text{Ca}^{2+}$  del espermatozoide <sup>21</sup>.

## 2.5 CALCIO INTRACITOPLASMÁTICO

El calcio intracitoplasmático de los espermatozoides juega un rol fundamental en las vías de señalización anteriormente mencionadas y su ocurrencia activa mecanismos que se encuentran debajo de las señales de capacitación. Se ha demostrado que una breve exposición a un ionóforo de calcio, específicamente

al A23187, produce una fuerte estimulación de la capacidad fértil de los espermatozoides <sup>22</sup>. Si bien el efecto inicial que produce este compuesto es la inmovilización de los espermatozoides, posterior al lavado de los mismos, el calcio disminuye su concentración y los espermatozoides recuperan su motilidad, desarrollando una motilidad hiperactivada. Por lo que cuando se exponen ovocitos, estos espermatozoides logran fecundarlos eficientemente, aun en ausencia de estímulos que promuevan la capacitación. Esto indicaría que, el aumento de calcio promovido en este caso, por el uso de un ionóforo de calcio, activa señales esenciales para que ocurra la fecundación de los gametos, las cuales se encuentran por debajo de la cascada de mecanismos necesarios para que el espermatozoide se capacite. Para comprobar esta hipótesis, se han realizado experimentos utilizando ratones estériles en los cuales, mediante modificación genética, se eliminó un componente clave para la capacitación espermática (Canales CatSper, canal de potasio SLO3, entre otros). En estos ratones, el tratamiento con ionóforo de calcio les permitió recuperar la fertilidad en una fertilización in vitro <sup>23</sup>.

En humanos, no hay estudios al respecto, aunque dichos estudios podrían tener una aplicación terapéutica directa, en caso de replicarse lo observado en ratones, en los que la manipulación de los niveles de calcio potenció la capacidad fértil de los espermatozoides. Además, el porcentaje de embriones que llegó a blastocisto, fue significativamente mayor y con un mayor número de crías vivas. Lo que sugiere que los niveles de calcio espermático tienen efectos beneficiosos en el desarrollo embrionario preimplantacional. Si bien, los mecanismos

involucrados aún no están dilucidados, estos hallazgos pueden tener una aplicación terapéutica directa en los pacientes.

Específicamente, mediante la incubación de los espermatozoides por cortos periodos de tiempo a temperaturas sensiblemente superiores a los 37°C (~40°C), se incrementan los porcentajes de hiperactivación debido a la apertura de los canales de calcio TRPV1 sensibles a la temperatura <sup>24</sup>.

Este procedimiento aceleraría la apertura de canales de calcio relacionados con la reacción acrosomal, aunque de forma no sincronizada, ya que sucedería en etapas tempranas de la capacitación. De esta manera, el efecto obtenido no es la reacción acrosomal en sí, sino la adquisición de hiperactivación de forma análoga a lo producido por ionóforo de calcio, previamente mencionado. Sin embargo, a diferencia de la estrategia del ionóforo de calcio, todas las etapas tempranas de la capacitación que preparan al espermatozoide para un posterior aumento tardío del calcio intracelular sufrirán activación normal ante el shock térmico, tal cual ocurre fisiológicamente.

Esto potenciaría la capacidad fecundante de los espermatozoides mediante un método indirecto (aumento de temperatura de incubación) para aumentar el calcio intracelular e incrementar la eficacia de los tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad.

## 2.6 FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO

La integridad del ADN espermático es esencial para una embriogénesis normal <sup>25</sup>. El ADN espermático está compactado seis veces más apretado que los

cromosomas de células somáticas <sup>26</sup>, aproximadamente un 50% menor que el de las células somáticas, para proteger el genoma del daño externo. El ADN espermático está organizado en dominios de bucles anclados en sus bases a la matriz nuclear, el cual está anclado a la base de la cola cuando están completamente relajados, lo que indica la presencia de una estructura similar a un anulo nuclear, el cual no puede ser aislado de la cola del espermatozoide debido a su inestabilidad estructural <sup>27</sup>.

En el espermatozoide, durante el proceso de condensación de la cromatina, las histonas son reemplazadas por proteínas de transición y son reconstruidas por protaminas, que son las proteínas de unión al ADN espermático <sup>28</sup>, que tienen la mitad del tamaño de las histonas y que están constituidas por residuos de arginina <sup>29</sup>.

El espermatozoide es altamente susceptible al estrés oxidativo por lo que se ha determinado como una de las causas de infertilidad masculina espontánea <sup>30</sup>. La causa más común del daño al ADN espermático es el estrés oxidativo <sup>29</sup>. Las principales fuentes de estrés oxidativo en el eyaculado son principalmente los leucocitos seminales y los espermatozoides anormales <sup>31</sup>, entre los que destacan los que tienen citoplasma residual o gota citoplasmática <sup>32</sup>.

La susceptibilidad reside en que durante periodo de condensación de la cromatina es muy susceptible, las células espermáticas no poseen mecanismos de reparación del ADN, la membrana contiene altos niveles de ácidos grasos polinsaturados, el espermatozoide produce especies reactivas de oxígeno (ERO) especialmente durante su paso por el epidídimo, los bajos niveles de enzimas antioxidantes en el citoplasma del espermatozoide, los largos periodos de tiempo que el

esperma pasa como células aisladas en los tractos genitales masculino y femenino. Sin embargo, existen antioxidantes seminales como el  $\beta$ -mercaptoetanol, proteínas, vitaminas E y C, cisteamina, cicteína, taurina e hipotaurina que contrarrestan los niveles de ERO en el semen.

La deficiencia de protaminas, las especies reactivas de oxígeno y la falta de reparación del daño del ADN se han asociado con una mayor fragmentación del ADN espermático, mientras que los antioxidantes dietéticos y la reparación del varicocele pueden mejorar la fragmentación del ADN espermático. La fragmentación de ADN puede provocar un desarrollo embrionario anormal después de la activación del genoma paterno.

Sin embargo, aunque esta se asocia con infertilidad masculina, no se han establecido puntos de corte específicos para cada ensayo <sup>33</sup>, entre los que se incluyen: el ensayo de electroforesis en gel de una sola célula (COMET), Ensayo de estructura de cromatina (SCSA), Prueba de Naranja de Acridina (AOT), Marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL) y la prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD) .

## **PREGUNTA DE INVESTIGACION**

Con el objetivo de incrementar la eficiencia de las TRA, el aumento de los niveles de calcio intracelular espermático mediante un método indirecto tal como el aumento de temperatura de incubación por cortos periodos de tiempo, incrementaría el potencial fecundante de los espermatozoides. Sin embargo, es necesario garantizar que este tratamiento no causa degradación del ADN espermático, y corroborar que este tratamiento consigue la motilidad hiperactivada del esperma.

Por lo que las preguntas de investigación que se trató de responder en el presente trabajo fueron:

1. ¿Los espermatozoides incubados a 40°C adquieren características de motilidad hiperactivada con respecto a los incubados a 37°C?
2. ¿Existe diferencia en el porcentaje de fragmentación de ADN espermático entre las muestras incubadas a 37°C y las incubadas a 40°C?

## **CAPITULO III: HIPÓTESIS**

### **3.1 HIPÓTESIS NULA**

El aumento de la temperatura durante la incubación espermática produce una motilidad hiperactivada de los espermatozoides sin ocasionar daño en el ADN.

### **3.2 HIPÓTESIS ALTERNA**

El aumento de la temperatura durante la incubación espermática no produce una motilidad hiperactivada de los espermatozoides y puede ocasionar daño en el ADN.

## **CAPITULO IV:**

### **4. OBJETIVOS**

1. Comparar el efecto que tiene la incubación de espermatozoides a temperatura elevada (40°C) y la incubación en temperatura fisiológica (37°C) en los parámetros de motilidad espermática.
2. Evaluar si la temperatura de incubación a la que se somete la muestra de esperma (37°C y 40°C) afecta la tasa de fragmentación del ADN espermático.

## **CAPITULO V:**

### **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo, no aleatorizado. Ya que no encontramos reportes previos con respecto a este tema, se llevó a cabo un estudio a nivel piloto, con un tamaño de muestra de 20 pacientes.

Específicamente, se incluyeron pacientes masculinos de entre 20 y 45 años, con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León durante el año 2020 y que se sometieron a técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (FIV e ICSI).

Se consideraron como candidatos a participar en el presente estudio a aquellos pacientes que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

### Criterios de inclusión

Hombres que consultaron por infertilidad:

a) Varones de 20 a 45 años; b) con motilidad espermática mayor al 15%; c) cuenta espermática mayor a 10 millones por mililitro.

### Criterios de exclusión

Hombres sin diagnóstico de infertilidad:

a) Varones menores de 20 años o mayores de 45 años; b) con motilidad espermática menor al 15%; c) cuenta espermática menor a 10 millones por mililitro, o pacientes que no aceptaron participar en el estudio posteriormente a la explicación detallada del consentimiento informado.

### Procedimiento

Antes de iniciar con el estudio de investigación se le explicó al paciente con lenguaje coloquial el objetivo, así como el procedimiento a realizar y se comprobó si el paciente entendió la información, posterior a lo cual se procedió a la firma del formato de consentimiento informado. Posteriormente, el sujeto de investigación proporcionó la muestra de esperma.

Para proteger la confidencialidad se recabó y registró la información personal confidencial acerca de la salud y del tratamiento mediante la revisión del expediente clínico, dicha información no contiene nombre completo ni domicilio de los participantes.

Se le proporcionó al paciente un recipiente plástico estéril, donde mediante masturbación con abstinencia sexual mínima de 3 días depositó la muestra. Las muestras de semen provenientes de pacientes infértiles fueron procesadas de manera habitual, donde se registraron los parámetros espermáticos básicos: concentración, motilidad y morfología mediante espermograma convencional siguiendo las recomendaciones del manual de la OMS para y además mediante el sistema CASA.

Con el objetivo de recuperar las formas móviles, la muestra fue procesada por el método de capacitación espermática de swim-up o gradiente.

El swim-up es una técnica de procesamiento de esperma muy común para la FIV y se usa con mayor frecuencia para muestras con una concentración de esperma promedio o buena y motilidad (13). Mediante ésta, los espermatozoides móviles pueden seleccionarse aún más por su capacidad de migrar fuera del plasma seminal y al medio de cultivo. Brevemente, el método consiste en lavar la muestra de semen con medio de cultivo HHTF, luego agregar de 0.5 a 1 mL de medio de cultivo. Después de 1 hora de incubación (tiempo de migración), se toma el sobrenadante cercano a la interfase con la muestra, el cual contendrá espermatozoides altamente móviles. Finalmente, es resuspendido en un volumen de aproximadamente 0.5 mL.

El gradiente de densidad es el método más utilizado para el procesamiento de esperma después de la masturbación o electro-eyaculación en laboratorios

de FIV (13). Este se fundamenta en que los espermatozoides morfológicamente normales, los anormales y los desechos tienen diferentes densidades. Como resultado de las diferencias de densidad, los espermatozoides móviles normales penetran en las densidades más altas en la dirección de la fuerza de centrifugación, mientras que los espermatozoides morfológicos inmóviles o anormales se retienen en los límites de las interfaces. Esta técnica aísla la subpoblación de espermatozoides con la mejor motilidad, morfología y presuntamente con mejor calidad de ADN nuclear y mitocondrial. El gradiente más común utilizado para el procesamiento de espermatozoides en la FIV es discontinuo. En el cual se coloca un volumen de una suspensión de alta densidad (80% a 90%) seguido de uno de menor densidad (40% a 45%). La muestra de semen se coloca encima de la preparación antes descrita y se centrifuga. En el presente estudio se centrifugó a 1300 fuerza centrífuga relativa (RCF) durante 10 minutos.

Posterior a la capacitación, los espermatozoides recuperados fueron separados en 2 fracciones de 50  $\mu$ L en un tubo eppendorf de 0.6 ml. Uno de ellos incubado a 37°C y el otro a 40°C durante 1 hora en un baño de agua.

Después del tiempo de incubación, se registró la motilidad de los espermatozoides por el sistema CASA IVOS versión 12.3 (Hamilton Thorne Biosciences, USA). Con un énfasis en los valores de VCL (Velocidad Curvilínea), ALH (amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza) y LIN (Índice de linealidad) ya que son reflejo de la motilidad hiperactivada.

En las muestras post-incubación además se estudió la fragmentación del ADN espermático utilizando el kit comercial Halosperm (HalotechDNA, Madrid, España) el cual se basa en la técnica SCD. Se siguieron las recomendaciones del fabricante, el procedimiento tiene una duración de 1.5 horas, consta de 3 etapas en las que los espermatozoides son inmersos en un microgel de agarosa y distribuidos en una laminilla, posteriormente la muestra es tratada con una solución ácida desnaturalizante y una solución de lisis, y finalmente se deshidrata, tiñe y se visualiza por microscopía de campo claro<sup>34</sup>. Las laminillas fueron tenidas con el kit de tinción de campo claro HT-BFS (HalotechDNA, Madrid, España).

### **5.1 Análisis estadístico**

Se creó una base de datos en Microsoft Excel con los parámetros obtenidos del espermograma, los datos de los parámetros de motilidad obtenidos mediante el sistema CASA, y los resultados de la fragmentación de ADN espermático. Para el análisis de los datos las variables continuas, fueron expresadas como medias con desviación estándar (SD) y las variables categóricas como frecuencias y/o proporciones relativas.

Se compararon los valores obtenidos de las muestras espermáticas incubadas a 37°C y 40°C mediante una prueba de T Múltiple corregida con el método Holm-Sidak. La comparación de la fragmentación espermática a las dos condiciones de incubación fue evaluada mediante la prueba exacta de Fisher.

Los análisis fueron realizados con el software GraphPad Prism 8 y se consideró estadísticamente significativo el valor de  $p < 0.05$

### **5.2 Tamaño de muestra**

Dado a que no existen estudios previos con respecto al tema abordado. Se realizó un estudio piloto que incluyó muestras de semen de 20 pacientes.

### **5.3 Comité de ética**

El proyecto fue sometido para aprobación por el comité de ética de esta institución. Se registró con la clave: GI19-00018

## CAPITULO VI

### 6. RESULTADOS

#### 6.1 Características de los pacientes

El presente estudio incluyó un total de 20 pacientes que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva del Hospital Universitario UANL, durante el año 2020. Los pacientes tuvieron en promedio  $36.9 \pm 5.3$  años, un peso de  $77.3 \pm 9.46$  kg, un índice de masa corporal (IMC) de  $26.1 \pm 2.64$  kg/m<sup>2</sup>, y  $3.44 \pm 1.04$  días de abstinencia sexual al momento de la recolección de la muestra espermática (Tabla 1).

**Tabla 1.- Descripción de participantes**

	Media $\pm$ DS	Min-máx.
Edad	<b><math>36.9 \pm 5.3</math></b>	<b>28-47</b>
Peso (Kg)	<b><math>77.3 \pm 9.46</math></b>	<b>70-85</b>
IMC	<b><math>26.1 \pm 2.64</math></b>	<b>24.4-30.1</b>
Abstinencia (Días)	<b><math>3.44 \pm 1.04</math></b>	<b>2-5</b>

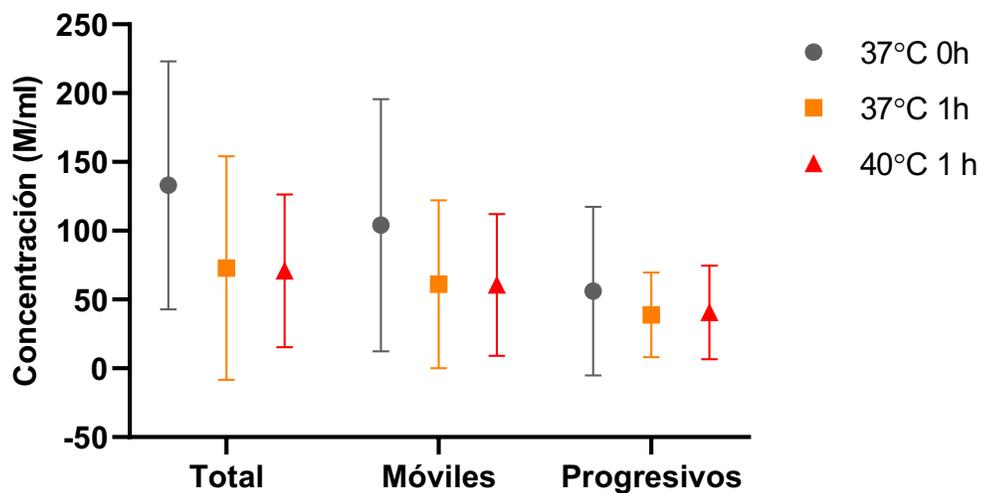
En cuanto a la descripción clínica de los pacientes, el 5% (n= 1) refirió consumo de alcohol ocasional, y el 15% (n=3) refirieron consumo de alcohol y tabaco sin especificar en cuanta cantidad. Ningún paciente refirió diagnóstico de hipertensión arterial sistémica y/o diabetes mellitus.

Se realizó un espermograma inicial, siguiendo las recomendaciones del manual de la Organización Mundial de la Salud en su 10ª edición. En cuanto al volumen las muestras tuvieron entre 0.6-5.5 ml con un promedio de  $2.19 \pm 1.29$  ml. En cuanto a concentración, esta fue de 30 -337 millones por mililitro con un valor promedio de  $153 \pm 87.5$  M/ml. Las muestras analizadas reportaron una vitalidad desde 39-98%, con un promedio de  $72.1 \pm 16.9$  y una morfología normal de  $7.78 \pm 2.51$  (Tabla 2).

**Tabla 2.- Descripción inicial de los parámetros espermáticos de las muestras incluidas en este estudio.**

	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b>Min-máx.</b>
<b>Volumen (ml)</b>	$2.19 \pm 1.29$	0.6-5.5
<b>Concentración [M/ml]</b>	$153 \pm 87.5$	30-337
<b>Vitalidad [%]</b>	$72.1 \pm 16.9$	39-98
<b>Morfología normal [%]</b>	$7.78 \pm 2.51$	4-14

A continuación, se compararon las concentraciones totales, de formas móviles y con motilidad progresiva inicial y posterior a la incubación a 37°C y 40°C (Figura 1). Se observó una disminución no significativa con respecto a los valores iniciales, lo cual es propio de la capacitación espermática, mediante la cual se eliminó una proporción de células, lo que es el objetivo de ese procedimiento, sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 1).



**Figura 1.- Concentraciones inicial y post incubación de espermatozoides totales, móviles y progresivos.**

Al comparar con respecto a la comparación de las concentraciones inicial y post incubación a 37°C de espermatozoides totales, móviles y progresivos. No se encontraron diferencias significativas, por lo que el tratamiento de una hora de incubación, no disminuyó el número de espermatozoides viables en la muestra (Tabla 3).

**Tabla 3.- Comparación de las concentraciones inicial y post incubación de espermatozoides totales, móviles y progresivos.**

	<b>Inicial</b>	<b>Post- incubación</b>		
	<b>37 °C</b>	<b>37 °C</b>	<b>p-valor</b>	<b>p-valor ajustado*</b>
<b>Total [M/ml]</b>	133 ± 90.2	72.8 ± 81.3	0.033	0.095
<b>Progresivos [M/ml]</b>	104 ± 91.6	61.6 ± 61.6	0.089	0.169
<b>Móviles [M/ml]</b>	56.1 ± 61.2	38.8 ± 30.7	0.266	0.266

\* Prueba de T Múltiple corregida con el método Holm-Sidak

Además, no hubo diferencias entre la incubación a 37 °C y 40 °C con respecto a la concentración total, móviles y progresivos (Figura 1 y Tabla 4).

**Tabla 4.- Comparación de las concentraciones post incubación de espermatozoides totales, móviles y progresivos.**

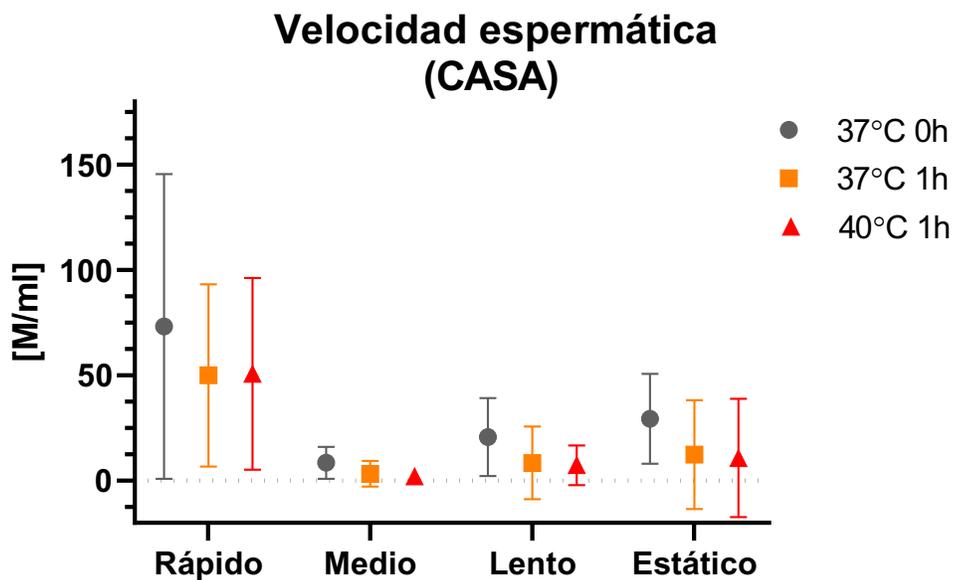
	Post - incubación		p-valor	p-valor ajustado**
	37 °C	40 °C		
<b>Total [M/ml]</b>	72.8 ± 81.3	70.8 ± 55.5	0.928	0.997
<b>Progresivos [M/ml]</b>	61.6 ± 61.6	60.6 ± 51.4	0.982	0.997
<b>Móviles [M/ml]</b>	38.8 ± 30.7	40.6 ± 33.9	0.861	0.997

\* Prueba de T Múltiple corregida con el método Holm-Sidak

## 6.2 Comparación de los parámetros de hipermotilidad espermática

El CASA subdivide las células contabilizadas con respecto a su velocidad. Al utilizar esta clasificación para comparar según la temperatura de incubación, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en ninguna de estas categorías usando una prueba múltiple de T con una corrección con el método Holm-Sidak (Figura 2 y Tabla 5).

Figura 2.- Velocidad espermática inicial y post capacitación.



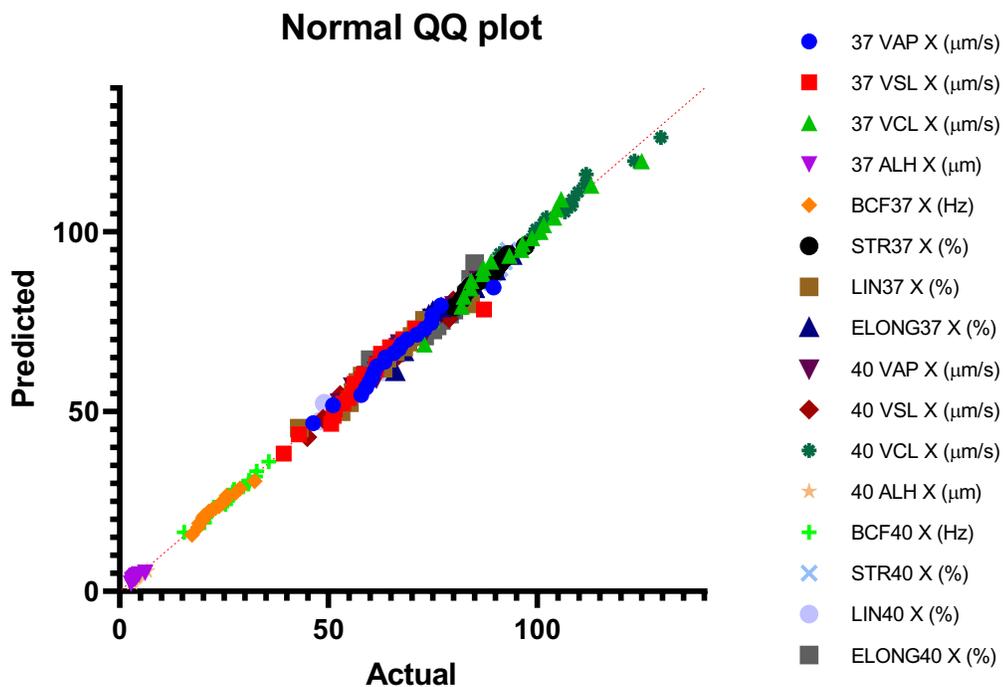
**Tabla 5.- Comparación de las concentraciones post incubación de espermatozoides clasificados según su velocidad por el sistema CASA.**

<b>Velocidad</b>	<b>37 °C</b>	<b>40 °C</b>	<b>p-valor</b>	<b>p-valor ajustado*</b>
<b>Rápido</b>	50.0 ± 43.2	50.8 ± 45.5	0.956	0.992
<b>Medio</b>	3.33 ± 6.16	2.10 ± 3.23	0.446	0.906
<b>Lento</b>	8.49 ± 17.3	7.35 ± 9.43	0.802	0.992
<b>Estático</b>	12.4 ± 25.9	10.8 ± 28.1	0.856	0.992

\*Prueba de T Múltiple corregida con el método Holm-Sidak

En la Figura 3, se presenta un QQ plot en el que se observa que los datos obtenidos de los parámetros de motilidad obtenidos mediante el análisis de las muestras post incubación mediante el sistema CASA, presentaron una distribución normal, además la prueba de Kolmogorov-Smirnov indicó normalidad de los datos. Por lo cual fue válido hacer comparaciones estadísticas usando una prueba de T para comparar medias de dichos parámetros.

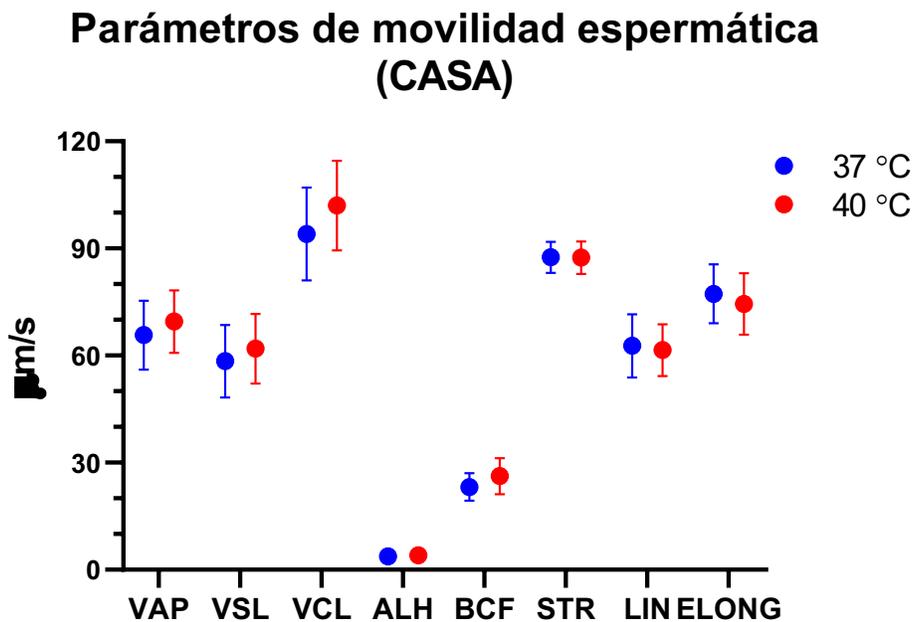
**Figura 3.- QQ plot de los parámetros de motilidad espermática obtenidos mediante el CASA.**



Los parámetros de motilidad (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR & LIN) fueron comparados a ambas temperaturas con una prueba de T-test múltiple y se ajustaron los valores de p con el método Holm-Sidak.

En la figura 4 se observa que hubo una tendencia a un incremento en los parámetros de motilidad VAP, VSL, VCL y BSF. Mientras que los valores de ALH, STR, LIN fueron similares en ambas temperaturas de incubación. Interesantemente, la elongación fue menor en los espermias incubados a 40°C. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 6).

Figura 4.- Comparación de los parámetros de motilidad espermática post incubación a 37°C y 40°C.



**Tabla 6.- Comparación de los parámetros de motilidad post - incubación.**

	<b>37°C</b>	<b>40°C</b>	<b>p-value</b>	<b>Adjusted p-value*</b>
<b>VAP (µm/s)</b>	65.7 ± 9.63	69.5 ± 8.72	0.199	0.670
<b>VSL (µm/s)</b>	58.4 ± 10.2	61.9 ± 9.71	0.273	0.670
<b>VCL (µm/s)</b>	94.1 ± 13	102 ± 12.6	0.058	0.303
<b>ALH (µm)</b>	3.72 ± 0.785	4.05 ± 0.85	0.220	0.670
<b>BCF (Hz)</b>	23.2 ± 3.83	26.2 ± 5.48	0.047	0.287
<b>STR</b>	87.5 ± 4.33	87.4 ± 4.52	0.943	0.943
<b>LIN</b>	62.7 ± 8.83	61.5 ± 7.21	0.641	0.871
<b>ELONG</b>	77.3 ± 8.25	74.4 ± 8.6	0.283	0.735

Prueba de T Múltiple corregida con el método Holm-Sidak

Mediante la prueba exacta de Fisher se encontró que hubo una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.001$ ) en la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado con respecto a la temperatura de incubación (Tabla 7).

**Tabla 7.- Número de espermatozoides con ADN fragmentado o ADN no-fragmentado a las diferentes temperaturas de incubación.**

	<b>ADN fragmentado</b>	<b>ADN no-fragmentado</b>	<b>Total</b>
<b>37 °C</b>	449	5560	6009
<b>40 °C</b>	543	5459	6002
<b>Total</b>	992	11019	12011

Sin embargo, la prueba exacta de Fisher solo permite saber que existe diferencia entre los grupos de las diferentes categorías.

## **CAPITULO VII:**

### **DISCUSION**

El concepto de hiperactivación espermática surgió de las observaciones de Yanagimachi a finales de los 60's, del cambio del patrón de motilidad de espermatozoides de hámster previo y posterior a la capacitación. Este fenómeno, consistía en un movimiento vigoroso que se sugirió confería poder de propela mediante el cual el esperma alcanzaría la zona de fertilización, y ayudaría a atravesar la zona del cúmulo del ovocito y la zona pelúcida <sup>35</sup>. De ahí que la hiperactividad espermática se ha correlacionado con la fertilidad. Este fenómeno ha sido observado en múltiples especies animales incluida la humana.

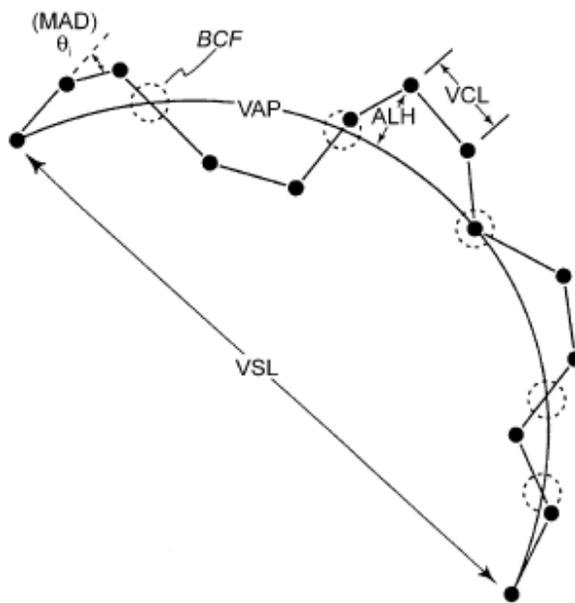
En humanos, se identificó que solo una proporción del esperma es capaz de hiperactivarse síncronamente después de una incubación en condiciones capacitantes <sup>36,37</sup>. Más recientemente, el uso de los sistemas de análisis computarizado del semen (CASA) aunado al análisis multivariado han evidenciado la existencia de subpoblaciones de parámetros cinéticos y morfométricos en eyaculados de diferentes especies, en otras palabras, los eyaculados no son homogéneos <sup>38</sup>.

Este es el primer estudio en humanos que se realiza a nuestro conocimiento, para evaluar la motilidad hiperactivada de los espermatozoides por medio de la incubación a una temperatura de 40°C.

Una de las ventajas del presente estudio radica en la utilización de la técnica computarizada es que se minimiza el factor subjetivo del análisis de examen rutinario de semen. Entre las ventajas del uso de estos sistemas se encuentran la rapidez de análisis, la baja variación técnica y la capacidad de cuantificar parámetros y subclasificar las células por su patrón de movimiento como rápido, rápido progresivo, normal y estático <sup>38</sup>.

En estos sistemas, el análisis de motilidad refleja una serie de medidas derivadas del análisis del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a través del tiempo mediante el procesamiento de imágenes consecutivas de la muestra. Una de las desventajas de su uso es que estos sistemas se basan en la medición de los movimientos de la cabeza del espermatozoide, lo cual indirectamente mide el movimiento flagelar <sup>39</sup>.

En la figura 5 se presenta una adaptación de la representación esquemática de los parámetros de motilidad medidos por el CASA de Boyer et al. 1989 <sup>40</sup>.



**Figura 5. Esquema de los parámetros de motilidad medidos por CASA <sup>40</sup>.**

La captura inicial de la imagen proporciona un centroide para cada espermatozoide, posteriormente se deduce la localización de la célula. La conexión entre los centroides proporciona su trayectoria real o trayectoria curvilínea. La velocidad promedio con respecto al tiempo a lo largo de dicha trayectoria se denomina velocidad curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ). La trayectoria promedio es calculada, y la velocidad promedio en el tiempo a lo largo de la trayectoria se denomina velocidad de trayectoria media (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ). La velocidad a lo largo del trazo de una trayectoria recta desde la primera hasta la última posición de una cabeza de espermatozoide, se denomina velocidad de línea recta (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ). A la desviación en la posición del centroide hay una desviación de la trayectoria media, y esto se denomina amplitud del desplazamiento lateral de

la cabeza (ALH;  $\mu\text{m}$ ). Los puntos en los que la trayectoria curvilínea intercepta la trayectoria promedio, se denomina frecuencia de cruzamientos (BCF, Hz) <sup>35,38</sup>.

En el presente trabajo se observó que hubo una tendencia a un incremento en los parámetros de motilidad VAP, VSL, VCL y BSF cuando las muestras de esperma se incubaron a 40°C. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Mientras que los valores de ALH, STR, LIN fueron similares en ambas temperaturas de incubación. Interesantemente, la elongación fue menor en los espermias incubados a 40°C en comparación con los incubados a 37°C, esto es importante ya que una cabeza más elongada incrementa la velocidad de movimiento de los espermatozoides <sup>41</sup>, contrario a lo esperado. Sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa.

Kay y Robertson, realizaron una recopilación de las definiciones de los parámetros de motilidad para identificar la hiperactivación del esperma humano <sup>35</sup>. En ella se incluyen, los puntos de corte de 7 estudios realizados entre 1988-1995. Interesantemente, nuestros datos de VCL a ambas temperaturas de incubación fueron consistentes con la motilidad hiperactivada.

En contraste con los estudios iniciales, donde los tiempos de incubación *in vitro* reportados fueron de 3-4 horas, en el presente estudio empleamos tiempos de incubación de 1 hora. Esta selección se basó en observaciones recientes donde el tiempo mínimo para evidenciar la motilidad hiperactivada a 40°C fue de 60 minutos (comunicación personal con Dr. Mariano Buffone).

El método utilizado en el presente estudio, donde se comparan los parámetros de movimiento espermático mediante el sistema CASA del esperma que se

incuba en condiciones capacitantes con aquellos que no son incubados en estas condiciones, ya ha sido empleado por otros investigadores, con el objetivo de definir la hiperactivación de esperma de diferentes especies <sup>39</sup>.

Boryshpolets reporto que un cambio de 31-37°C, incremento la velocidad y disminuyo la frecuencia de eventos de giro de los espermias siendo capaces de observar la hiperactivación en un lapso de 3-10 minutos <sup>42</sup>. Sin embargo, nuestros hallazgos indican que la incubación a 40°C no confirió ninguna ventaja con respecto a la incubación a 37°C. Mas recientemente, Thijssen reporto que los espermias incubados a temperatura ambiente (23°C) presentaron una motilidad progresiva y morfología superior con respecto a los incubados a la temperatura fisiológica de los testículos (35°C), sin embargo la evaluación se realizó a las 24 horas <sup>43</sup>.

La morfología espermática es otro de los parámetros que han sido empleados como herramienta clínica para evaluar la infertilidad masculina. La cual es considerada como normal si la muestra posee  $\geq 4\%$  de formas normales. Las muestras analizadas en el presente estudio presentaron de 4-14% de formas morfológicamente normales. Sin embargo, evidencia reciente ha eliminado el valor pronóstico de la morfología ligado a bajas tasas de embarazo, cuando se usan las TRA <sup>44</sup>.

Adicionalmente, la integridad del ADN influye en la calidad seminal con potencial predictivo de la fertilidad. Valverde reportó que, aunque un espermatozoide con material genético aberrante fecunde un ovocito, el embrión resultante sufriría un proceso apoptótico durante el periodo de división de cuatro a ocho células <sup>38</sup>. En

otras palabras, la integridad del ADN es necesaria para una embriogénesis normal. Se considera que valores de fragmentación superiores al 30%, están asociados con una disminución de la probabilidad de éxito de las TRA. En el presente trabajo se evaluó si el tratamiento de temperatura al que se expusieron las muestras de espermatozoides no fue perjudicial en cuanto a la integridad del ADN espermático. Se encontró una diferencia significativa en cuanto a la fragmentación del ADN espermático en los grupos comparados. Los valores de SDF fueron de 7.49 y 9.05 % para los espermatozoides incubados a 37°C y 40°C respectivamente, por debajo de lo que es considerado como perjudicial.

Como perspectiva del presente trabajo realizaremos las mediciones descritas en las secciones anteriores de muestras de semen adicionales para lograr un mayor poder estadístico y corroborar nuestros hallazgos.

## **CAPITULO VIII:**

### **CONCLUSIONES**

Si bien el procedimiento realizado en este estudio ha sido empleado para estudiar la hiperactividad en semen de diferentes especies, en nuestro conocimiento, este es el primer estudio en humanos donde se evalúa la motilidad hiperactivada de los espermatozoides posterior a su incubación a una temperatura de 40 °C. Aunque no hubo una diferencia estadísticamente significativa, en los parámetros de motilidad espermáticos medidos por el sistema CASA, se observó que hay una tendencia al aumento en algunos de estos parámetros en las muestras incubadas a una temperatura de 40°C, en comparación con aquellas incubadas a 37°C. Desafortunadamente, en las muestras expuestas a esta temperatura se encontró una mayor fragmentación del ADN espermático, sin embargo por debajo del umbral asociado con una probabilidad de éxito disminuido de las TRA.

La principal limitante del estudio fue la obtención de muestras que cumplieran con los criterios de inclusión, dado que una gran proporción de los pacientes tienen alterados algunos de los parámetros espermáticos, principalmente la concentración y motilidad. Como perspectiva de este trabajo se procesarán muestras de semen adicionales para incrementar el poder estadístico de nuestro análisis y corroborar nuestros hallazgos o evidenciar una diferencia significativa en los valores con tendencia.

## CAPITULO IX: REFERENCIAS

1. CDC. Infertility FAQs. *Reproductive Health*, <https://www.cdc.gov/reproductivehealth/infertility/index.htm> (2019, accessed 26 November 2020).
2. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes [9]. *Nature*. Epub ahead of print 1951. DOI: 10.1038/168697b0.
3. WHO. Infertility, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility> (2020, accessed 26 November 2020).
4. Ortiz-Dominguez MES. Iniciativa para la ley general de reproduccion humana asistida. *Gaceta del Senado*, [https://www.senado.gob.mx/64/gaceta\\_del\\_senado/documento/38844](https://www.senado.gob.mx/64/gaceta_del_senado/documento/38844) (2012, accessed 25 November 2020).
5. AMMR. Situacion de la infertilidad en Mexico. *Blog/ Articulos de interes*, <https://ammr.org.mx/situacion-de-la-infertilidad-en-mexico/> (2018, accessed 25 November 2020).
6. González-Santos SP. From esterilología to reproductive biology: The story of the Mexican assisted reproduction business. *Reprod Biomed Soc Online*. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1016/j.rbms.2016.10.002.
7. Sharma RS, Saxena R, Singh R. Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective. *Indian Journal of Medical Research*. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_636\_18.
8. De Geyter C. Assisted reproductive technology: Impact on society and need for surveillance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2019; 33: 3–8.
9. CDC. ART Success Rates. *National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Division of Reproductive Health*, <https://www.cdc.gov/art/artdata/index.html> (2019, accessed 23 March 2020).
10. Bhandari HM, Choudhary MK, Stewart JA. An overview of assisted reproductive technology procedures. *Obstet Gynaecol*. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1111/tog.12509.
11. Brena Sesma I. La fecundacion asistida en Mexico. In: UNAM (ed) *La fecundacion in vitro en el sistema interamericano de justicia. Implicaciones para Mexico*. Ciudad de Mexico, Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico, pp. 103–121.
12. Bhakta HH, Refai FH, Avella MA. The molecular mechanisms mediating mammalian fertilization. *Development (Cambridge)*. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1242/dev.176966.
13. AUSTIN CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B*. Epub ahead of print 1951. DOI: 10.1071/BI9510581.
14. Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. Sperm motility hyperactivation facilitates

- penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 1995; 53: 1280–1285.
15. Okabe M. Sperm-egg interaction and fertilization: Past, present, and future. *Biology of Reproduction*. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1093/biolre/iory028.
  16. Buffone MG, Wertheimer E V, Visconti PE, et al. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim Biophys Acta* 2014; 4: 2610–2620.
  17. Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 1995; 171: 554–563.
  18. Santi CM, Martínez-López P, Vega-beltrán JL De, et al. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* 2010; 584: 1041–1046.
  19. Lishko P V., Botchkina IL, Fedorenko A, et al. Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. *Cell*. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.053.
  20. Meizel S, Deamer DW. The {pH} of the hamster sperm acrosome. *J Histochem Cytochem* 1978; 26: 98–105.
  21. Ren D, Navarro B, Perez G, et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. Epub ahead of print 2001. DOI: 10.1038/35098027.
  22. Tateno H, Krapf D, Hino T, et al. Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 18543–8.
  23. Navarrete FA, Alvau A, Lee HC, et al. Transient exposure to calcium ionophore enables in vitro fertilization in sterile mouse models. *Sci Rep* 2016; 6: 33589.
  24. Nilius B, Vennekens R, Owsianik G. Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels: An Overview. *Curr Pharm Des*. Epub ahead of print 2008. DOI: 10.2174/138161208783330763.
  25. Kadioglu A, Ortac M. The role of sperm DNA testing on male infertility. *Translational Andrology and Urology*. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.21037/tau.2017.03.82.
  26. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction*. Epub ahead of print 1991. DOI: 10.1095/biolreprod44.4.569.
  27. BARONE JEG, de LARA J, CUMMINGS KB, et al. DNA Organization in Human Spermatozoa. *J Androl*. Epub ahead of print 1994. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1994.tb00419.x.
  28. Rathke C, Baarends WM, Awe S, et al. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Epub ahead of print 2014. DOI:

- 10.1016/j.bbagrm.2013.08.004.
29. Kucuk N. Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm. *Türk Üroloji Dergisi/Turkish J Urol*. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.5152/tud.2018.49321.
  30. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol*. Epub ahead of print 2006. DOI: 10.1016/j.mce.2005.12.026.
  31. Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, et al. Etiologies of sperm oxidative stress. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.29252/ijrm.14.4.231.
  32. Zini A, Defreitas G, Freeman M, et al. Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. *Fertil Steril*. Epub ahead of print 2000. DOI: 10.1016/S0015-0282(00)00703-2.
  33. McQueen DB, Zhang J, Robins JC. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.003.
  34. HalotechDNA. Halosperm, <https://www.halotechdna.com/wp-content/uploads/2015/09/Halosperm-web.pdf>.
  35. Kay VJ, Robertson L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: A review of physiological function and application in assisted reproduction. *Human Reproduction Update*. Epub ahead of print 1998. DOI: 10.1093/humupd/4.6.776.
  36. Burkman LJ. Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: Comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Syst Biol Reprod Med*. Epub ahead of print 1984. DOI: 10.3109/01485018408987514.
  37. Mortimer D, Courtot AM, Giovangrandi Y, et al. Human sperm motility after migration into, and incubation in, synthetic media. *Gamete Res*. Epub ahead of print 1984. DOI: 10.1002/mrd.1120090203.
  38. Valverde A, Madrigal-Valverde M. Sistemas de analisis computadorizado de semen en la reproduccion animal. Epub ahead of print 2018. DOI: <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.29852>.
  39. Suarez SS, Ho HC. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim*. Epub ahead of print 2003. DOI: 10.1046/j.1439-0531.2003.00397.x.
  40. Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. Epub ahead of print 2004. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.12.006.
  41. Vicens A, Dorus S. La evolucion de las proteinas reproductivas y la diversificacion del espermatozoide. In: *El espermatozoide: una mirada desde Mexico*, pp. 12–43.
  42. Boryshpolets S, Pérez-Cerezales S, Eisenbach M. Behavioral mechanism of human sperm in thermotaxis: A role for hyperactivation. *Hum Reprod*. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1093/humrep/dev002.

43. Thijssen A, Klerkx E, Huyser C, et al. Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.12.005.
44. Kohn TP, Kohn JR, Lamb DJ. Role of Sperm Morphology in Deciding Between Various Assisted Reproduction Technologies. *European Urology Focus*. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1016/j.euf.2018.07.029.

## **CAPITULO X**

### **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Marco David del Cueto Aguilera

Candidato para el grado de Subespecialista en Biología de la  
Reproducción Humana

Tesis: Efecto de la incubación de esperma a alta temperatura sobre la motilidad  
espermática y la fragmentación del ADN.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Veracruz, Veracruz el 8 de febrero de 1990,  
hijo de Angel Noé del Cueto Morales (QEPD) y Ana Margarita Aguilera  
Morán.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León  
obteniendo el grado de Médico Cirujano y Partero en el 2013.

Experiencia Profesional: Residente de Segundo Año (2-2) de la  
Subespecialidad de Biología de la Reproducción Humana en el Hospital  
Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de  
Nuevo León.

Distinciones: Jefe de Residentes de la Subespecialidad de Biología de la  
Reproducción Humana en el periodo Marzo 2020- Febrero 2021

# CAPITULO XI

## SUMMARY

### **Introduction**

Infertility is defined as the failure of a couple to conceive after 12 months of sexual intercourse without the use of contraception in women under 35 years of age and after 6 months in women over 35 years of age.

The main treatment consists of the use of assisted reproductive techniques (ART). However, the success rates of ART are 30%, so they are not considered highly effective. Therefore, taking into account the low effectiveness of treatments and their growing demand, it is essential to improve existing treatments, including innovations that help improve performance.

### **Aims**

1. Compare the effect of sperm incubation at elevated temperature (40°C) and incubation at physiological temperature (37°C) on sperm motility parameters.
2. Evaluate whether the incubation temperature to which the sperm sample is subjected (37°C and 40°C) affects the rate of sperm DNA fragmentation.

## **Material and methods**

A prospective, comparative and non-randomized study was carried out at the pilot level. The study included male patients with a diagnosis of primary or secondary infertility who attended the University Center for Reproductive Medicine of the University Hospital “Dr. José Eleuterio González” during 2020 and who underwent assisted reproduction techniques, including in vitro fertilization (IVF) and cytoplasmic sperm injection (ICSI).

Sperm hyperactivation was assessed by measuring post-incubation sperm samples using the computer-aided sperm analysis system (CASA) with emphasis on curvilinear velocity (VCL), head lateral displacement amplitude (ALH) and linearity (LIN) reflecting hyperactivated motility. While the evaluation of sperm DNA fragmentation was performed after sperm incubation at 37°C and 40°C, with the in vitro diagnostic kit Halosperm (HalotechDNA, Spain).

## **Results**

No differences were found with respect to the concentration of total, motile and progressive sperm with respect to the incubation temperature. Although there was a trend towards an increase in the mobility parameters VAP, VSL, VCL and BSF, these differences were not statistically significant.

In contrast, there was a statistically significant difference in the proportion of sperm with fragmented DNA with respect to the incubation temperature.

**Conclusions**

Post-capacitation incubation of sperm, at a temperature of 40°C, did not cause an effect of sperm hyperarousal. Additionally, a difference in sperm DNA fragmentation was observed between sperm incubated at 37°C and 40°C.

**Keywords:**

Temperature, Sperm hyperactivation, DNA fragmentation, CASA.

## CAPITULO XII

### ANEXOS

#### 12.1 Aprobación del Comité de Ética en Investigación



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

**DR. MED. LUIS HUMBERTO SORDIA HERNANDEZ**

Investigador principal  
Departamento de Ginecología y Obstetricia  
Presente.-

Estimado Dr. Sordia:

Les informo que nuestro **Comité de Ética en Investigación** del Hospital Universitario "Dr. Jose Eleuterio Gonzalez", ha **evaluado y aprobado** el proyecto de investigación titulado: "**Efecto de la incubación de espermatozoides a alta temperatura sobre la motilidad espermática y la fragmentación del ADN**", registrado con la clave **GI19-00018**, participando además el Dr. Marco David del Cueto Aguilera, Dr. Felipe Arturo Morales Martínez, M.C. Martha Merino Ruiz y la Est. Brianda Enríquez Sáenz como Co-Investigadores. Además de los siguientes documentos.

- Protocolo en extenso 2.0 de fecha 15 de Noviembre del 2019.
- Formato de Consentimiento Informado, versión 2.0 de fecha 15 de Noviembre del 2019

Le pedimos mantenernos informados del avance o terminación de su proyecto.

Sin más por el momento, me despido de ustedes.

Atentamente,  
"Alere Flammas Veritatis"  
Monterrey, N.L. 19 de Diciembre del 2019

**DR. med. JOSE GERARDO GARZA LEAL**  
Presidente del Comité de Ética en Investigación



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

**Comité de Ética en Investigación**

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México  
Teléfonos: 818329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanel.com



## 12.2 Aprobación del Comité de Investigación



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

**DR. LUIS HUMBERTO SORDIA HERNANDEZ**

Investigador principal  
Departamento de Ginecología y Obstetricia  
Presente.-

Estimado Dr. Sordia:

En respuesta a su solicitud con número de Ingreso **PI19-00329** con fecha del **18 de Septiembre del 2019**, recibida en las Oficinas de la Secretaría de Investigación Clínica de la Subdirección de Investigación, se extiende la siguiente **DICTAMEN FAVORABLE** con fundamento en los artículos 4º párrafo cuarto y 16 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos; así como los artículos 14-16, 99 párrafo tercero, 102, 106 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud; así como de los artículos 111, 112 y 119 del Decreto que modifica a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud publicado el día 2 de abril del 2014; Además Punto 4.4, 4.7, 6.2, 8 de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; así como por el Reglamento interno de Investigación de Nuestra Institución.

Se le informa que el Comité a mi cargo ha determinado que su Protocolo de Investigación clínica abajo mencionado cuenta con la calidad técnica y mérito científico que la Sociedad Mexicana demanda.

**"Efecto de la incubación de esperma a alta temperatura sobre la motilidad espermática y la fragmentación del ADN"**, registrado con la clave **GI19-00018**.

A continuación se enlistan los documentos aprobados:

- Protocolo en extenso 2.0 de fecha 15 de Noviembre del 2019.

Le reitero que es obligación del Investigador principal presentar a este Comité de Investigación un informe técnico final.

Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior este debidamente consignado, en caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el beneficio y seguridad de todo el personal y sujetos en investigación.

Atentamente.-

"Alere Flammam Veritatis"

Monterrey, Nuevo León 19 de Diciembre del 2019



**DR. C. GUILLERMO ELIZONDO RIOJAS**  
Presidente del Comité de Investigación

### Comité de Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México  
Teléfonos: 81 8329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduani.com

