

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA**

Efecto inhibitor de la reacción acrosomal del espermatozoide humano por la presencia de especies reactivas de oxígeno en células del cúmulus

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Ana Laura Gutiérrez Silva

DIRIGIDA POR:

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

CO-DIRECTORA:

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie

Querétaro, Qro. a Noviembre de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



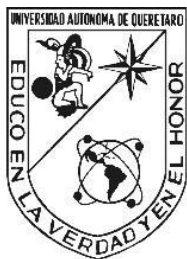
Efecto inhibitor de la reacción acrosomal del
espermatozoide humano por la presencia de especies
reactivas de oxígeno en células del cúmulus

por

Ana Laura Gutiérrez Silva

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-253087



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Efecto inhibitor de la reacción acrosomal del espermatozoide humano
por la presencia de especies reactivas de oxígeno en células del cúmulus**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO
DE**

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Ana Laura Gutiérrez Silva

DIRIGIDA POR:

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Co-dirigida por:

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Presidente

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie
Secretario

Dra. Guadalupe García Alcocer
Vocal

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Suplente

Dra. Haydé Vergara Castañeda
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre de 2023
México

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Infertilidad.....	5
2.2 De los gametos a la fertilización.....	6
2.2.1 Espermatozoide y acrosoma.....	7
2.2.2 El ovocito y las células del cúmulus.....	10
2.2.2.1 Células del cúmulus.....	13
2.2.3 Eventos clave de la fertilización.....	15
2.3.1 Papel fisiológico de las ROS en la reproducción.....	17
2.3.2 Mecanismos antioxidantes.....	18
2.3.3 Fisiopatología del estrés oxidativo en los gametos.....	20
2.4 Cuantificación de ROS.....	22
2.5 Técnicas de reproducción asistida.....	24
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	27
5. HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS	27
6.1 Objetivo General.....	27
6.2 Objetivos específicos.....	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
8. RESULTADOS	33
9. DISCUSIÓN.....	41
10. CONCLUSIÓN	45
11. REFERENCIAS.....	46
12. ANEXOS	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Comparación de los valores de referencia para los parámetros evaluados en el análisis de semen humano. (OMS 1980-2021).	9

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Espermatogénesis.....	8
2. Estructura del espermatozoide humano	10
3. Diagrama del desarrollo y maduración del folículo	12
4. El folículo, el ovocito y las células del cúmulus	14
5. Mecanismos contra ROS en las células del cúmulus	20
6. El peróxido de hidrógeno altera la reacción acrosomal	33
7. El H ₂ O ₂ aumenta las ROS en las células del cúmulus.	34
8. Sistema antioxidante en las células del cúmulus	35
9. Las células del cúmulus son inductoras de la reacción acrosomal	37
10. El estrés oxidativo en células del cúmulus inhibe la reacción acrosomal	38
11. Correlación entre las especies reactivas de oxígeno en células del cúmulus y la reacción acrosomal en el espermatozoide humano	39
12. Efecto del estrés oxidativo en células del cúmulus sobre la secreción de progesterona	40

ACRÓNIMOS

ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RA:	Reacción acrosomal
CC:	Células del cúmulus
ZP:	Zona pelúcida
COC:	Complejo ovocito-células del cúmulus
SOD:	Superóxido dismutasa
CAT:	Catalasa
GPx:	Glutación peroxidasa
GSH:	Glutación
O₂^{•-}:	Anión superóxido
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
OH[•]:	Radical hidroxilo
NO[•]:	Óxido nítrico
ONOO[•]:	Peroxinitrito
N₂O:	Óxido nitroso
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
HTF:	Human Tubal Fluid
PBS:	Buffer fosfato salino
HSA:	Albúmina sérica humana
PSA-FITC:	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada con FITC
ATP:	Adenosín trifosfato
NADPH:	Nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato
AMP_c	Monofosfato de adenosina cíclico
PUFA:	Ácidos grasos poliinsaturados
MDA:	Malondialdehído
NOX:	Oxidasa de NADPH
4HNE:	4-hidroxinonenal
8-OHdG:	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
RLU:	Unidad relativa de luz
H₂DCFDA:	Diclorodihidrofluoresceína
DCF:	2', 7'-diclorofluoresceína fluorescente
dUTP:	Desoxinucleótidos
TdT:	Transferasa terminal
HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento
CG-MS:	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
ELISA:	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FIV:	Fertilización <i>in vitro</i>
TRA:	Técnicas de reproducción asistida
ICSI:	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
DGP:	Diagnóstico genético preimplantacional
IUI:	Inseminación intrauterina
IA:	Inteligencia artificial
ESHRE:	Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología
CDC:	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
RPBI:	Residuo Peligroso Biológico Infeccioso
EO:	Estrés oxidativo

P4: Progesterona
TRA: Técnicas de reproducción asistida
NOX5: NADPH oxidasa 5
SOP: Síndrome de ovario poliquístico

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis la Dra. Laura Cristina Berumen Segura y la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie mi más sincero agradecimiento por guiarme, apoyarme y motivarme durante el desarrollo de este trabajo. Por otro lado, agradezco a la Dra. Guadalupe García Alcocer, a la Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera y a la Dra. Haydé Vergara Castañeda por aceptar la invitación a formar parte del comité evaluador de mi trabajo de tesis.

Además, recibe reconocimiento el Dr. José Islas Varela y al Biol. Juan Daniel Luna Andón, el grupo de investigación “acrosómicos” formado por Aída Díaz y Arturo Torres, así mismo a la Dra. Irasema Mendieta y a la M. en C. Dulce Caraveo, por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

Asimismo, quiero expresar mi gratitud por el financiamiento otorgado a CONAHCYT a través de la beca de posgrado con número 1144963.

Finalmente, pero no menos importante a mis padres, a mi hermana María Paula, a Marco A. Martínez Marú y a mis seres queridos, quienes me acompañan y me brindan la motivación para seguir superándome.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

RESUMEN

La infertilidad sigue siendo un reto de la medicina reproductiva y ha cobrado gran importancia debido a que el 15 % de la población en edad fértil padece de este problema de salud pública mundial. A su vez, el estrés oxidativo (EO), ocasionado por las especies reactivas de oxígeno (ROS), se ha convertido en un epicentro para comprender mejor la complejidad de este padecimiento. Un mecanismo de defensa contra el EO en el ovocito es la barrera que lo rodea, las células del cumulus (CC); más allá de esto, tienen la capacidad de inducir la reacción acrosomal (RA), un paso fundamental en la fecundación. Por consiguiente, este estudio consistió en identificar el efecto del EO inducido en las CC sobre la interacción de la AR en espermatozoides humanos mediante microscopia de fluorescencia usando la tinción PSA-FITC. Se demostró que las CC son inductoras de la RA en el espermatozoide humano. En particular, se demostró que las ROS inhiben la capacidad de las CC para inducir la RA en el espermatozoide humano en un 22.42 ± 3.69 % y se correlacionan de manera negativa con la funcionalidad del espermatozoide, alteran el balance redox así como la secreción de progesterona.

Palabras clave: infertilidad, ROS, reacción acrosomal, células del cúmulus.

ABSTRACT

Infertility remains a challenge in reproductive medicine and has gained significant importance since 15% of the population of childbearing age suffers from this global public health problem. In turn, oxidative stress (OS), caused by reactive oxygen species (ROS), has become an epicenter for a better understanding of this condition's complexity. One defense mechanism against OS in the oocyte is the barrier surrounding it, the cumulus cells (CC); beyond this, they can induce the acrosomal reaction (AR), a fundamental step in fertilization. Therefore, this study aims to identify the effect of EO induced in CC on AR interaction in human spermatozoa by fluorescence microscopy using PSA-FITC staining. CC were shown to be inducers of AR in human spermatozoa. In particular, ROS were shown to inhibit the ability of CC to induce AR in human spermatozoa by 22.42 ± 3.69 % and negatively correlate with sperm functionality, altering redox balance and progesterone secretion.

Keywords: infertility, ROS, acrosome reaction, cumulus cells

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo se estima que existen 48 millones de parejas que padecen infertilidad (World Health Organization, 2020). Es una enfermedad multifactorial asociada al sistema reproductivo femenino y masculino que dificulta la posibilidad de conseguir un embarazo (Cannarella *et al.*, 2020; Ribas-Maynou y Yeste, 2020). Los factores que se han identificado que afectan a los pacientes engloban distintas condiciones médicas, genética, el estilo de vida, así como factores ambientales y sociales (Bellver y Donnez, 2019). De igual manera, el estrés oxidativo se ha ligado fuertemente con la infertilidad en hombres y mujeres. Además, se sabe que es una condición patológica propiciada por un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad protectora de los mecanismos antioxidantes propios de las células (Aitken, 2020; Lin y Wang, 2021). Se ha evidenciado que impacta negativamente en la calidad de los gametos y el desarrollo embrionario, por ejemplo el estrés oxidativo compromete la integridad del ADN del espermatozoide de modo que ocurre una fragmentación, lo que implica una reducción en las posibilidades de fertilizar al ovocito con éxito (Gualtieri *et al.*, 2021). Por otro lado, la cantidad excesiva de ROS en el ovocito causa un daño importante al proteoma repercutiendo en la meiosis, la fecundación y el desarrollo embrionario (Peters *et al.*, 2020). Un mecanismo de defensa contra las ROS en el ovocito es la barrera que lo rodea, las células del cúmulus (CC), además de desempeñar funciones que le ayudan a volverse competente para la fertilización (von Mengden *et al.*, 2020). Uno de los rasgos más llamativos de estas células, es la capacidad que tienen para inducir la reacción acrosomal (RA), un paso fundamental en la fertilización, un paradigma que se ha roto es el sitio en el que se lleva a cabo esta reacción, gracias a Jin y col. (2011) quienes demostraron que las CC inducían la RA en espermatozoides de ratón, además mostraron que ayudaban a aumentar la incidencia de fertilización en los ovocitos que no las poseían, por lo tanto, se sugiere que las CC inducen la RA y desempeñan un papel importante en la fertilización (Tamburrino *et al.*, 2020).

Por otro lado, las técnicas de reproducción asistida se presentan como una alternativa integral para tratar la infertilidad; actualmente se presume que han

ayudado a concebir a 8 millones de bebés en el mundo, no obstante, la tasa de éxito se mantiene en un 30 %, más aún, este porcentaje decae con la edad materna (De Geyter, 2019; Kanaka *et al.*, 2022).

Con todo lo anterior, existe una brecha del conocimiento de la interacción que guardan las CC, bajo estrés oxidativo con la RA. Por consiguiente, la finalidad de este estudio es identificar la relación que existe entre las ROS presentes en las CC y la actividad de las enzimas que participan en los mecanismos de control antioxidante con la RA en el espermatozoide humano (Agarwal *et al.*, 2021; Gong *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021). Esta investigación tiene la finalidad de generar información valiosa que ayude a comprender mejor la influencia del estrés oxidativo en las capas externas del ovocito con la capacidad fertilizante del espermatozoide así mismo, para generar estrategias que ayuden en la práctica clínica a optimizar las probabilidades de lograr un embarazo mediante el uso de las técnicas de reproducción asistida (Duffy *et al.*, 2021; Siu *et al.*, 2021).

2. ANTECEDENTES

2.1 Infertilidad.

La infertilidad se caracteriza por ser una patología asociada al sistema reproductivo femenino y masculino que altera la probabilidad de una concepción exitosa, después de un año de intimidad sexual sin el uso de métodos anticonceptivos. Se posiciona como un importante asunto de salud pública alrededor del mundo, con un estimado de 48 millones de parejas en edad reproductiva que la padecen (Cannarella *et al.*, 2020; Ribas-Maynou y Yeste, 2020; World Health Organization, 2020).

A su vez, la infertilidad es una enfermedad multifactorial que involucra la incompetencia de los gametos para interactuar o fusionarse, esto derivado de un error desde su producción además de la incapacidad de mantener un embrión en crecimiento y desarrollo (Cannarella *et al.*, 2020). Los factores que se han identificado que afectan a los pacientes engloban distintas condiciones médicas, genética, el estilo de vida, así como factores ambientales y sociales (Bellver y Donnez, 2019). El factor del estrés oxidativo se ha posicionado como uno de los más importantes cuando se habla de infertilidad, es señalado como la causa del 30 al 80 % de los casos de infertilidad, atribuido al factor masculino (Agarwal *et al.*, 2022; Evans *et al.*, 2021). Además, varios autores han demostrado que decrece la funcionalidad y la calidad de los gametos femeninos y masculinos, más aún el desbalance de las especies reactivas de oxígeno, puede desencadenar patologías en ambos sistemas reproductivos (Aitken, 2020; Gualtieri *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2018; Ribas-Maynou y Yeste, 2020).

Las condiciones médicas que desempeñan un papel crucial en la disminución de la fertilidad femenina, se deben a la disfunción ovulatoria derivada de una insuficiencia ovárica o del síndrome de ovario poliquístico, lesiones u obstrucciones de las trompas de Falopio y la endometriosis (Farquhar *et al.*, 2019) Asimismo, el varicocele, la disfunción sexual y síndromes ocasionados por anomalías cromosómicas o genéticas como el Síndrome de Klinefelter son factores médicos

que se asocian al decaimiento de la fertilidad masculina (Agarwal *et al.*, 2022). Existen otros factores de riesgo que afectan la fertilidad en hombres y mujeres que son producto del modo de vida de los pacientes como el uso de cigarro, alcohol, cafeína, la exposición a sustancias tóxicas, desórdenes metabólicos y la obesidad. También la edad, es un factor muy importante que afecta predominantemente a las mujeres, existen estudios que asocian la edad avanzada de los padres (mayor a 35 años) con altas tasas de alteraciones cromosómicas como lo es el Síndrome de Down además de anomalías congénitas (Agarwal *et al.*, 2022; Bellver y Donnez, 2019; Farquhar *et al.*, 2019).

2.2 De los gametos a la fertilización.

Para entender mejor las causas de infertilidad es clave la comprensión de los procesos que dirigen la producción de gametos de calidad además de la serie de eventos que implica una fertilización exitosa. La fertilización es uno de los eventos más importantes en la naturaleza en la que se involucra la fusión de los gametos y culmina en la formación de un nuevo individuo (Jiménez-Movilla *et al.*, 2021; R. Xu *et al.*, 2021). Es un acontecimiento que depende de varias interacciones moleculares, sin embargo, los mecanismos que median la unión de los gametos aún se mantienen desconocidos debido a la naturaleza transitoria del evento y a que es un mecanismo altamente organizado y dinámico (Jiménez-Movilla *et al.*, 2021). Sin embargo, se han identificado una serie de pasos que son imprescindibles para que se realice la fusión espermatozoide-ovocito; la capacitación, RA, penetración de la zona pelúcida y finalmente acoplamiento y fusión con la membrana del ovocito (Cannarella *et al.*, 2020; Siu *et al.*, 2021). Un paradigma que se ha roto es el sitio en el que ocurre la RA, gracias al trabajo realizado por Jin y col. (2011) demostrando que las CC inducían la RA en espermatozoides de ratón, además, evidenciaron que estas células aumentaron la incidencia de fertilización *in vitro* de ovocitos libres de cúmulus, lo que destaca la importancia de las CC en el proceso de fertilización y su papel como inductoras de la RA en espermatozoide (Tamburrino *et al.*, 2020).

2.2.1 Espermatozoide y acrosoma

El gameto masculino se presenta como una célula que posee características específicas, para llevar a cabo su principal función que es transmitir su copia haploide de ADN al ovocito, aunque también se ha evidenciado que aporta el factor activador de ovocitos y el centriolo, que ayuda a conformar los husos mitóticos, más aún recientemente se ha reportado que también provee una reserva de ARN mensajero al cigoto (Alves *et al.*, 2020; Oehninger y Kruger, 2021).

Para cumplir con su función en la fertilización el espermatozoide se forma mediante la espermatogénesis; este evento que ocurre en el testículo y que está regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (figura 1), implica una compleja serie de procesos donde en primer lugar, las células de Leydig secretan testosterona y ocurre un crecimiento de los testículos, mientras tanto, las células de Sertoli regulan la espermatogénesis en los túbulos seminíferos. Por otra parte, la transformación de las espermatogonias a espermatocitos se desencadena para su posterior división mitótica y recibir el nombre de espermátidas que ya adquirieron la característica haploide; también durante esta etapa se desencadena la formación de estructuras accesorias, como la formación del acrosoma, que es una vesícula derivada de Golgi localizada en la parte anterior del gameto cuyo contenido comprende enzimas hidrolíticas expulsadas durante la RA así como el desarrollo del axonema (Aldana *et al.*, 2021; Bracke *et al.*, 2018; Oehninger y Kruger, 2021; Siu *et al.*, 2021). Finalmente, la espermatogénesis culmina cuando los espermatozoides maduros morfológicamente se desplazan hacia los túbulos seminíferos y el epidídimo donde se almacenan para adquirir su motilidad (Oehninger y Kruger, 2021).

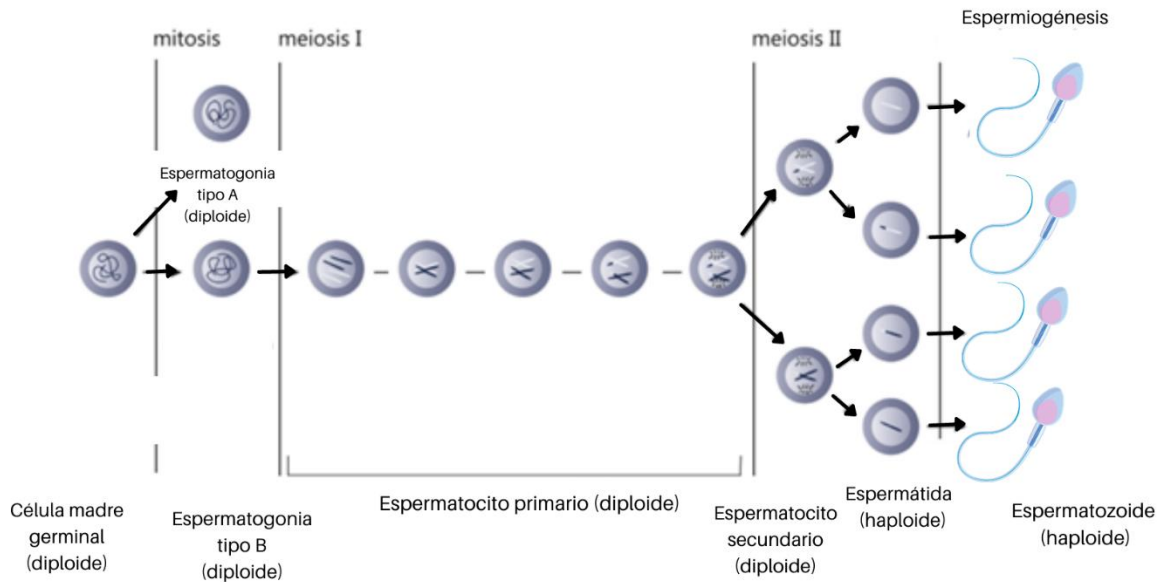


Figura 1. Espermatogénesis. Es un proceso finamente orquestado que involucra la transformación de las espermatogonias diploides a través de la meiosis para convertirse en espermatidas haploides y dar lugar a espermatozoides maduros. (Ibtisham y Honaramooz, 2020; Siu *et al.*, 2021). Imagen adaptada (Bracke *et al.*, 2018).

Por otro lado, el semen se evalúa como un indicador del potencial de fertilidad masculina. A nivel internacional, el manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se toma como referencia para analizar el semen humano en el laboratorio, hasta el momento se han publicado seis ediciones y las diferencias entre ellas se muestran en el Cuadro 1 (Alves *et al.*, 2020; Oehninger y Kruger, 2021). De acuerdo con este manual los valores de referencia consideran que más del 4% de los espermatozoides sean clasificados como morfológicamente normales y se considera normal aquellos que tienen cabeza (con acrosoma), parte media y flagelo con determinadas proporciones (Danis y Samplaski, 2019; Oehninger y Kruger, 2021). Se considera que un espermatozoide posee estas dimensiones de longitud 3 a 5 μm y entre 2 a 3 μm de ancho para ser catalogado como normal (Agarwal *et al.*, 2021).

Cuadro 1. Comparación de los valores de referencia para los parámetros evaluados en el análisis de semen humano (OMS 1980-2021). Cuadro adaptado de Agarwal *et al.* (2021)

	1 ed. (1980)	2 ed. (1987)	3 ed. (1992)	4 ed. (1999)	5 ed. (2010)	6 ed. (2021)
Volumen	ND	≥ 2 mL	≥ 2 mL	≥ 2 mL	≥ 1.5 mL	≥ 1.4 mL
Concentración de espermatozoides (10⁶/mL)	20-200	20	20	20	15	16
Cuenta total de espermatozoides (10⁶)	≥ 40	≥ 40	≥ 40	≥ 40	≥ 39	≥ 39
Motilidad de los espermatozoides (% progresivos)	≥ 60 %	≥ 50 %	≥ 50 %	≥ 50 %	≥ 32 %	≥ 30 %
Vitalidad de los espermatozoides (%)	ND	≥ 50 %	≥ 75 %	≥ 75 %	≥ 58 %	≥ 54 %
Morfología (% normal)	≥ 80.5 %	≥ 50 %	≥ 30 %	≥ 15 %	≥ 4 %	≥ 4 %

Abreviaciones: ND, no definido.

Independientemente de la morfología, un espermatozoide tiene características estructurales que se dividen en dos partes principales; la cabeza y el flagelo (figura 2) (Alves *et al.*, 2020). En la cabeza se localiza el núcleo, donde se ubica el ADN condensado y el acrosoma localizado en la parte apical; en particular su contenido se encuentra rodeado de una membrana externa denominada membrana acrosomal externa y una membrana acrosomal interna. La primera está en contacto con la membrana celular del espermatozoide, mientras que la membrana interna rodea la envoltura nuclear (Aldana *et al.*, 2021; Khawar *et al.*, 2019; Oehninger y Kruger, 2021).

En cuanto a la parte del flagelo, se pueden identificar la zona media, la principal y la terminal. En la zona media se pueden localizar los centriolos en el cuello y las mitocondrias dispuestas en forma de hélice, el axonema que se ubica a lo largo del flagelo, que se compone de dos microtúbulos centrales y nueve dobletes periféricos;

continuando con la zona principal donde se extiende el axonema y alrededor de este se encuentran otras dos estructuras denominadas fibras densas externas, y la vaina fibrosa (Alves *et al.*, 2020; Oehninger y Kruger, 2021). Así cada estructura cumple con una función, que en conjunto le da la capacidad a la célula, para llegar a la ampolla o ámpula de la trompa de Falopio, donde comúnmente ocurre la fertilización (Thunnissen *et al.*, 2021).

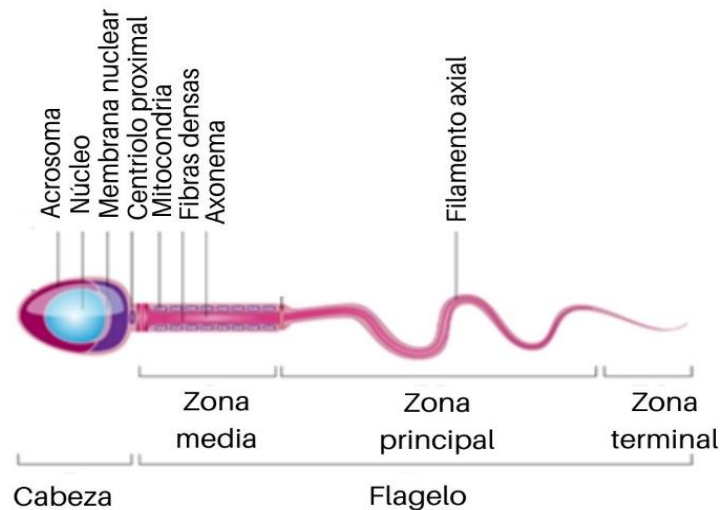


Figura 2. Estructura del espermatozoide humano. En el gameto masculino, la morfología es un criterio que tiene un gran valor al predecir el éxito de la fertilización. Estructuralmente en la célula se pueden identificar la cabeza, la pieza media y el flagelo. En la primera se encuentran el núcleo y el acrosoma, esta estructura debe abarcar del 40 al 70 % del área, mientras que en la pieza media se ubican las mitocondrias y debe ser aproximadamente del mismo largo que la cabeza, después en la zona principal se extiende el axonema, las fibras densas externas y la vaina fibrosa (Alves *et al.*, 2020; Dai *et al.*, 2021).

2.2.2 El ovocito y las células del cúmulus

El ovocito se considera esencial para la reproducción al igual que su contraparte masculina (Rodrigues *et al.*, 2021). Su maduración y desarrollo se lleva a cabo dentro del ambiente del folículo ovárico, que se compone de células somáticas de

dos tipos; células de la granulosa y células de la teca, además del ovocito que se encuentra rodeado de ellas (Orisaka *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2021).

El desarrollo del folículo o foliculogénesis es un evento complejo que implica la interacción del hipotálamo, la hipófisis y el ovario para dar lugar a un ovocito maduro y competente para la fertilización (figura 3) (Bosch *et al.*, 2021; von Mengden *et al.*, 2020); es una sucesión de eventos muy largos que comienza desde la etapa embrionaria hasta la menopausia. Durante la primera etapa, la oogonia se encuentra en estado de proliferación para dar lugar al ovocito primario y continúa hasta que entra a meiosis donde queda en arresto en profase I (Andronico *et al.*, 2019). Alrededor de la semana 12 de gestación, células de la pregranulosa comienzan a circundar al ovocito e inicia una estrecha comunicación entre estas dos entidades (Ford *et al.*, 2020), así se forma el folículo primordial, que entra en un periodo latente. Posterior al nacimiento, una mujer tiene aproximadamente 2 millones de ellos representando su reserva ovárica (Orisaka *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2021). El crecimiento y posterior activación del folículo primordial lleva al siguiente estadio que se denomina folículo primario, que sigue su viaje para formar los folículos secundarios, durante esta etapa se puede apreciar al ovocito circundado por una porción de células somáticas conocidas por su capacidad de producir hormonas, además de aquella población que delimita al folículo, las células de la teca (Orisaka *et al.*, 2021; Rimon-Dahari *et al.*, 2016). El siguiente paso es la formación del folículo antral, previo a que sea ovulado el ovocito y ocurre después de la pubertad. Durante esta fase se puede identificar la formación de una cavidad o un antro que contiene fluido folicular, además se aprecia la separación de dos poblaciones de las células de la granulosa, las murales que se ubican en la pared interna del folículo y aquellas que se conocen como cúmulus oóforos o células del cúmulus (CC) (Bosch *et al.*, 2021; Orisaka *et al.*, 2021; Rimon-Dahari *et al.*, 2016; Tu *et al.*, 2019). Este estadio depende de las gonadotropinas liberadas por la hipófisis, en especial se necesita a la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), ambas actúan en sinergia y de manera complementaria para seguir con la historia natural del folículo. Cabe destacar que la FSH posee un efecto directo sobre las células de la granulosa mientras que la LH estimula a las

células de la teca (Bosch *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2021). En cuanto a la FSH, es esencial para la supervivencia del folículo, la proliferación de las células de la granulosa, la expresión del receptor de la hormona luteinizante (LHR), así como la selección de ovocito (Casarini y Crépieux, 2019; Rimon-Dahari *et al.*, 2016). Por su parte, la LH desata una secuencia de sucesos que implican la condensación de la cromatina y que los ovocitos avancen a metafase I, después se observa la extrusión del cuerpo polar que indica que ha ocurrido la meiosis I para, detenerse en metafase II, lo que muestra que es un ovocito maduro, listo para ser ovulado con la posibilidad de ser fecundado y conseguir el desarrollo de un embrión normal (Andronico *et al.*, 2019; He *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020).

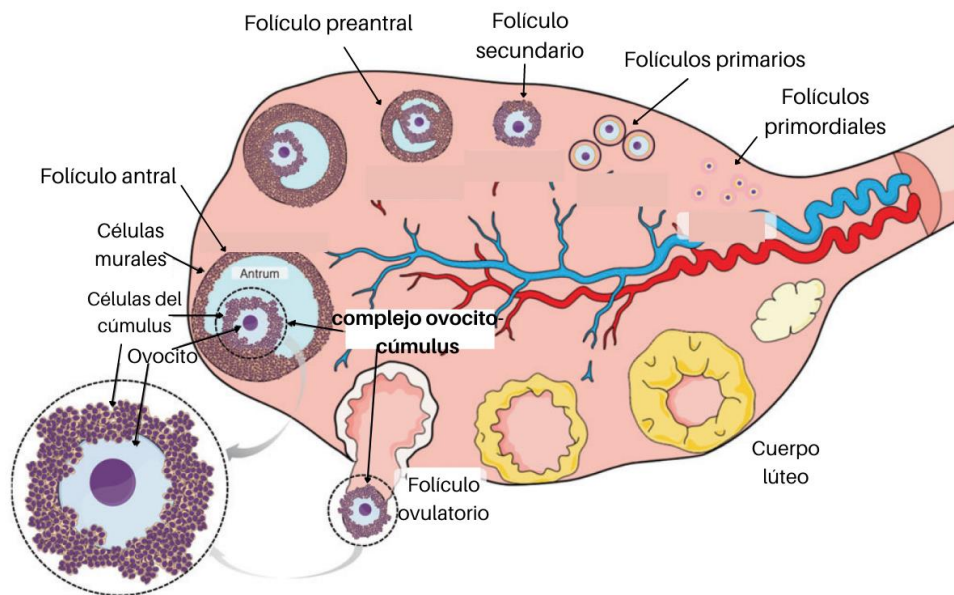


Figura 3. Diagrama del desarrollo y maduración del folículo. El desarrollo y maduración del ovocito se relaciona con el crecimiento folicular, inicia con los folículos primordiales, siguiendo con los folículos primarios y secundarios hasta llegar al folículo antral y dar paso a la ovulación de un ovocito competente para la fertilización (von Mengden *et al.*, 2020).

2.2.2.1 Células del cúmulus.

La comunicación bidireccional entre las células de la granulosa y el ovocito posee un alcance fundamental en el desarrollo del folículo, así como para generar un ovocito competente (Rodrigues *et al.*, 2021). Existen dos poblaciones funcionales de las células de la granulosa que se diferencian en el transcurso de la formación del folículo antral, las células murales y las células del cúmulus (CC) (Turathum *et al.*, 2021). Este último grupo envuelve al ovocito, además, se distingue una primera capa denominada corona radiata, cabe señalar que en conjunto con el ovocito se conoce como complejo ovocito-células del cúmulus (COC) (figura 4) (Turathum *et al.*, 2021; von Mengden *et al.*, 2020). Un rasgo que vuelve a las CC una entidad importante en el estudio de la fertilidad es la comunicación en ambos sentidos que mantiene con el ovocito, lo hacen mediante proyecciones transzonales que poseen filamentos de actina que ayudan a atravesar la zona pelúcida y se unen mediante uniones gap (Rodrigues *et al.*, 2021; Turathum *et al.*, 2021). Las uniones gap por su parte, las componen conexinas que se acomodan de tal forma que crean un poro en la membrana, lo cual las convierte en reguladoras de las moléculas que cruzan como, por ejemplo, iones, metabolitos, aminoácidos y moléculas de señalización que viajan desde las células de la granulosa hasta el ovocito entre otros factores secretados por el mismo que sirven como señalización paracrina en las CC (Rodrigues *et al.*, 2021; Turathum *et al.*, 2021; von Mengden *et al.*, 2020).

Las CC desempeñan varias funciones indispensables para el desarrollo y maduración del ovocito (von Mengden *et al.*, 2020). Y a su vez, el ovocito produce factores paracrinos que tienen su efecto sobre las células somáticas que lo acompañan (Richani *et al.*, 2021). El diálogo que existe entre el ovocito y las CC recae parcialmente en las necesidades metabólicas de ambas entidades. Ejemplo de ello, es la incapacidad del ovocito de utilizar a la glucosa como sustrato energético, por lo que depende de las CC para que le provea metabolitos resultantes de la glucólisis como el piruvato y lactato para producir ATP (adenosín trifosfato) mediante fosforilación oxidativa (Richani *et al.*, 2021; Turathum *et al.*, 2021). Otra ruta biosintética importante es la vía de las pentosas, se ha reportado que contribuye notablemente a la competencia del ovocito además de generar NADPH

(nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato) una molécula importante para el mecanismo antioxidante del ovocito (Richani *et al.*, 2021). Por otro lado, el metabolismo de lípidos también establece la aptitud del ovocito, se ha demostrado que la beta-oxidación es de vital importancia para que avance a metafase II en ratón (Richani *et al.*, 2021; Turathum *et al.*, 2021). Hay que mencionar, además que las CC regulan la meiosis aportando mensajeros secundarios como el monofosfato de adenosín cíclico (AMPc), el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) y otras moléculas reguladoras al ovocito para mediar la comunicación COC (Turathum *et al.*, 2021).

Por todo lo anterior las CC, demuestran que están estrechamente implicadas en el crecimiento, la maduración, la ovulación además ayudan al desarrollo embrionario. Lo que implica que pueden utilizarse como un indicador de la salud del ovocito y del folículo (Turathum *et al.*, 2021; von Mengden *et al.*, 2020).

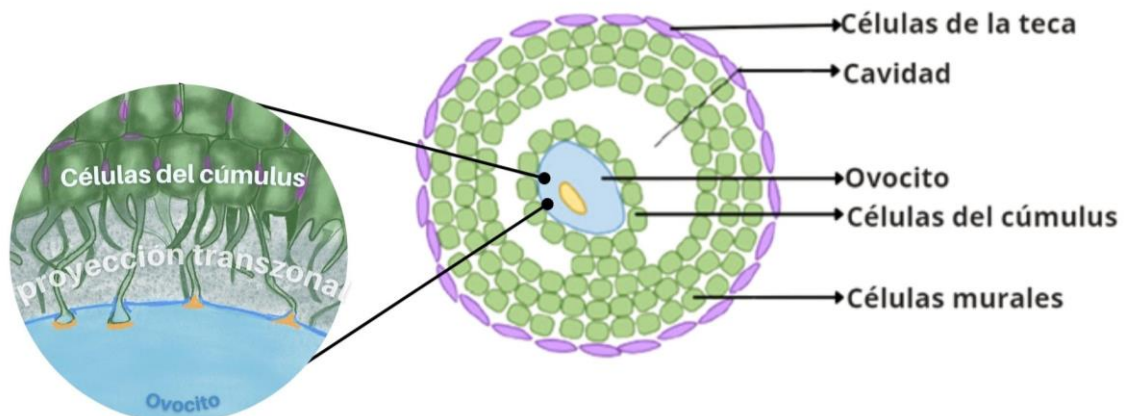


Figura 4. El folículo, el ovocito y las células del cúmulus. En el último estadio del folículo, antes de que ocurra la ovulación del ovocito, se observa la cavidad o antro que separa a dos poblaciones de células somáticas, las adyacentes al ovocito; las células del cúmulus y las células murales. Además, se aprecian las proyecciones transzonales que se prolongan a través de la zona pelúcida hasta el ovocito, así mismo se muestran las uniones gap que unen a las células del cúmulus entre sí, a través de estas estructuras viajan factores secretados en ambos sentidos (Rimon-Dahari *et al.*, 2016; Winterhager y Kidder, 2015). Imagen adaptada (Ford *et al.*, 2020; Winterhager y Kidder, 2015).

2.2.3 Eventos clave de la fertilización.

Para lograr una fertilización exitosa naturalmente deben suceder una gama de eventos que implican cambios fisiológicos en el espermatozoide (Gahlay y Rajput, 2020). En primer lugar, sucede la capacitación que se refiere a las modificaciones funcionales que le otorga al espermatozoide la habilidad de fecundar al ovocito, este acontecimiento ocurre en el viaje del espermatozoide por el tracto genital femenino hasta que llega al sitio de fertilización (Dey *et al.*, 2019; Park y Pang, 2021). Durante este proceso los espermatozoides experimentan la eliminación de esteroides como el colesterol y algunas glicoproteínas, para obtener una membrana más fluida (Gahlay y Rajput, 2020; Park y Pang, 2021); lo siguiente que ocurre es la hiperpolarización de la membrana, que se relaciona con un incremento del pH y el calcio intracelular, y a su vez con CatSper, un canal iónico que consta de 4 subunidades ubicado en el flagelo, sensible al pH, permeable al ión calcio (Ca^{2+}) y levemente controlado por voltaje (Aldana *et al.*, 2021; Gahlay y Rajput, 2020). Lo anterior da como resultado un cambio en el patrón de motilidad del espermatozoide, es decir una hiperactivación, caracterizada por una curvatura flagelar profunda y asimétrica que facilita su progresión al sitio de fertilización y le da la facultad de enlazarse con la zona pelúcida (ZP) (Aldana *et al.*, 2021; Park y Pang, 2021; Wang *et al.*, 2021); cabe mencionar que solo del 20 al 40 % de los espermatozoides se capacitan, más aún la capacitación es un prerrequisito para que ocurra la RA (Aldana *et al.*, 2021; Park y Pang, 2021).

En el último paso de la capacitación, el espermatozoide experimenta un evento excitotico excepcional conocido como reacción acrosomal (RA), que implica el acoplamiento de la bicapa lipídica externa del acrosoma con la membrana plasmática para expulsar el material acrosomal (Balestrini *et al.*, 2020; Evans *et al.*, 2021; Khawar *et al.*, 2019). Se han identificado dos principales enzimas hidrolíticas que participan en la RA, acrosina y hialuronoglucosaminidasa 5. La primera se encuentra en la matriz acrosomal como proacrosina y su acción es similar a la tripsina, la segunda actúa como catalizador en la degradación del ácido hialurónico en las CC (Balestrini *et al.*, 2020; Gahlay y Rajput, 2020).

El sitio en el que ocurre la RA ha creado controversia debido a que se creía que era un evento que se llevaba a cabo exclusivamente en la ZP, sin embargo, gracias a Jin y col. (2011) se ha demostrado que cuando el espermatozoide atraviesa las CC, ellas también inducen la reacción (Tamburrino *et al.*, 2020). Las CC actúan como una barrera selectiva porque poseen un microambiente compuesto por matriz extracelular, carbohidratos y proteínas, además de hormonas secretadas por ellas mismas, de ahí la importancia de las enzimas hidrolíticas expulsadas en la RA ya que facilitan cambios en la membrana y por consiguiente se proporciona un andamiaje proteico estable al inducir la relocalización de IZUMO1 y SPACA6, ambas proteínas indispensables en la unión espermatozoide-ovocito (Chen *et al.*, 2013; Gahlay y Rajput, 2020; Siu *et al.*, 2021). En especial se ha reportado que la progesterona es el inductor más potente de la RA, se sabe que induce la reacción entre 20 % y 30 % de la población celular (Siu *et al.*, 2021). La secreción de la hormona progesterona estimula activamente el flujo del ión calcio (Ca^{2+}) que es necesario para el acoplamiento de las membranas, plasmática y acrosomal del espermatozoide (Aldana *et al.*, 2021; Tamburrino *et al.*, 2020). Más aún la progesterona estimula el movimiento flagelar, controla el acoplamiento de la zona pelúcida y el espermatozoide y por lo tanto la fertilización (Turathum *et al.*, 2021).

En el momento, que el espermatozoide y el ovocito hacen contacto, entran en juego unas glicoproteínas que se encuentran en la ZP, se han denominado proteínas ZP y en reportes recientes se indica que existen al menos cuatro de ellas (ZP-1,2,3, y 4) hasta el momento se ha evidenciado que en humanos la proteína ZP2 es la principal mediadora de la unión espermatozoide-ovocito sobre todo con los espermatozoides que han experimentado la RA, no obstante, aún se encuentra bajo investigación el papel que juega cada una (Gupta, 2021; Jiménez-Movilla *et al.*, 2021; Siu *et al.*, 2021). Finalmente, el espermatozoide logra penetrar al ovocito uniéndose al oolema donde existen otro tipo de receptores que previenen la poliespermia, para culminar en la fusión de ambas células. Cabe destacar que todos estos procesos están altamente regulados en los que participan moléculas, cascadas de señalización altamente especializadas para que el reconocimiento, unión y fusión de los gametos se logre exitosamente (Jiménez-Movilla *et al.*, 2021),

sin embargo, aún quedan preguntas sin resolver que están siendo una motivación en el campo de la medicina reproductiva.

2.3 Estrés oxidativo, ROS y fertilidad.

El estrés oxidativo se ha correlacionado fuertemente con la infertilidad en hombres y mujeres. Se sabe que es provocado por un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el poder protector de los mecanismos antioxidantes propios de las células (Aitken, 2020; Lin *et al.*, 2020). En particular, las ROS son especies altamente reactivas debido a que algunas se presentan como radicales libres, es decir, poseen electrones desapareados que les da la capacidad de reaccionar con las biomoléculas en las células, en este contexto se encuentran el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), además de algunos átomos de nitrógeno, conocidas como especies reactivas de nitrógeno (RNS) por ejemplo, óxido nítrico (NO^{\bullet}), el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) y el óxido nitroso (N_2O) (Aitken, 2020; Nowicka-Bauer y Nixon, 2020).

2.3.1 Papel fisiológico de las ROS en la reproducción.

Las ROS son parte de procesos fisiológicos importantes en el organismo incluyendo el desarrollo y función de los gametos. Se pueden distinguir las ROS que vienen de fuentes endógenas y exógenas. En las primeras se identifica que derivan de la actividad mitocondrial, fosforilación oxidativa, además de las enzimas citoplasmáticas llamadas NOX (oxidasa de NADPH) y la activación de células inflamatorias como los leucocitos (Agarwal *et al.*, 2019; Almansa-Ordonez *et al.*, 2020; Gualtieri *et al.*, 2021; Nowicka-Bauer y Nixon, 2020; Ribas-Maynou y Yeste, 2020); también se ha reportado que las ROS provienen de eventos fisiológicos implicados en el desarrollo de los gametos como la espermatogénesis y foliculogénesis donde se ha identificado al citocromo P450 como fuente de ROS en el folículo (Barati *et al.*, 2020; von Mengden *et al.*, 2020).

Las fuentes exógenas de ROS surgen del modo de vida de los pacientes, como fumar, beber alcohol, la intensa actividad física, el estrés y los hábitos alimenticios

o patologías, en particular SOP (síndrome de ovario poliquístico) y endometriosis en mujeres, así como el varicocele en hombres por mencionar las importantes (Nowicka-Bauer y Nixon, 2020; Ribas-Maynou y Yeste, 2020; von Mengden *et al.*, 2020).

Las ROS tienen un rol clave en los procesos fisiológicos de la fertilización como la capacitación, hiperactivación, RA y la fusión con el ovocito (Gualtieri *et al.*, 2021; J. Lin y Wang, 2021). En la capacitación se ha demostrado el papel fundamental que tienen el H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, y especies reactivas de nitrógeno, por ejemplo, $\text{NO}\bullet$ y peroxinitrito (Barati *et al.*, 2020; Evans *et al.*, 2021).

En particular, en la RA se ha demostrado que en pequeñas concentraciones actúan el H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\cdot-}$, como inductores de este evento además de que media la interacción espermatozoide-ovocito y su posterior fusión (Aitken *et al.*, 2022; Gualtieri *et al.*, 2021; Ribas-Maynou y Yeste, 2020). Se ha reportado que el H_2O_2 actúa en la capacitación, la RA y en la fusión de gametos, anulando la actividad de la tirosina fosfatasa, estimulando la producción de AMPc y mediando el desprendimiento de colesterol de la membrana (Aitken *et al.*, 2022). Asimismo, se ha evidenciado que la liberación de óxido nítrico (NO) también es esencial para poner en marcha la capacitación de los espermatozoides e inducir la RA (Barati *et al.*, 2020; Otasevic *et al.*, 2020).

2.3.2 Mecanismos antioxidantes

Los mecanismos antioxidantes que contrarrestan las ROS se han estudiado ampliamente, por lo que se sabe que existen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos encargadas del balance redox (Agarwal *et al.*, 2019). Dentro de los mecanismos enzimáticos se encuentra la familia de la superóxido dismutasa (SOD) que transforma al superóxido a oxígeno, a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, se sabe que en humanos existen tres isoformas; Cu/ZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2), que se localizan en citosol y mitocondria respectivamente además de Cu/ZnSOD (SOD3) localizada en el espacio extracelular (Eleutherio *et al.*, 2021).

También se reconoce la acción reductora de la catalasa (CAT) que estimula la reducción de H_2O_2 a O_2 y H_2O , además posee un centro activo de protoporfirina férrica IX, utiliza NADPH como cofactor y se localiza principalmente en peroxisomas (Galasso *et al.*, 2021). Otra enzima antioxidante sumamente distinguida es glutatión peroxidasa (GPx), esta pertenece a una familia de selenoproteínas que desempeñan la función de inactivar al peróxido de hidrógeno y al hidróxido de lípidos, igualmente se conocen 5 isoformas GPx 1 a 4 y 6, siendo la GPx1 la más abundante en humanos (Brigelius-Flohé y Flohé, 2020).

Finalmente, la mayor actividad antioxidante intracelular se lleva a cabo por el glutatión (GSH), es una molécula tiol, se compone de cuatro aminoácidos principales; glicina, glutamina y cisteína, además se sintetiza exclusivamente en citosol. La actividad de GSH recae en reducir los radicales peroxinitrito, superóxido e hidroxilo (Bjørklund *et al.*, 2021; Y. Wang *et al.*, 2021).

En el ovocito las CC son las responsables de mediar la actividad antioxidante y por consiguiente brinda protección contra las ROS (figura 5), se ha reportado que actúa la GPx que utiliza a GSH como cofactor para llevar a cabo su función antioxidante, además se ha identificado a SOD y una glutatión-S- transferasa (GSTs), que forman parte de una gran familia de enzimas que protegen del daño oxidativo a las membranas (von Mengden *et al.*, 2020). Mientras que, en el espermatozoide, la GPx y la peroxiredoxina (PRDX) son las enzimas antioxidantes más abundantes; se ha reportado que la GPx es sintetizada principalmente en los testículos y en la zona media del espermatozoide maduro (Nowicka-Bauer y Nixon, 2020).

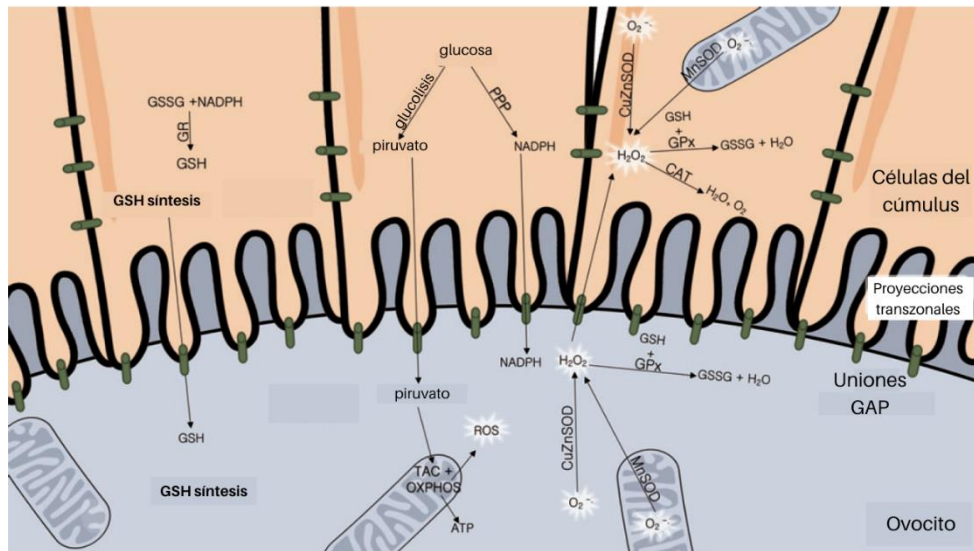


Figura 5. Mecanismos contra ROS en las células del cúmulus. Las CC son las que protegen al ovocito de las ROS, y lo hacen mediante la producción de CAT, SOD, GSH y GPx por mencionar algunos de los mecanismos antioxidantes. Abreviaturas. CC: células del cúmulus, ROS: especies reactivas de oxígeno, CAT: catalasa, GPx: glutatió peroxidasa, SOD: superóxido dismutasa, GSH: glutatió (von Mengden *et al.*, 2020).

2.3.3 Fisiopatología del estrés oxidativo en los gametos.

La paradoja de las ROS recae en el balance entre ellas y los mecanismos antioxidantes de las células, cuando se rompe el balance se induce un estado de estrés oxidativo que provoca daño a nivel celular en los gametos y se relaciona con una disminución en su calidad y el desarrollo embrionario (Agarwal *et al.*, 2019; Aitken *et al.*, 2022).

En el espermatozoide el estrés oxidativo altera su capacidad de fertilizar mediante diversos mecanismos. Uno de ellos es la peroxidación lipídica, es decir, la degradación oxidativa de los lípidos. En la membrana celular del gameto masculino se encuentran en forma de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). La peroxidación lipídica se lleva a cabo en tres etapas consecutivas; la iniciación, propagación y terminación. Comienza con el ataque de los radicales libres que toman electrones de los PUFA, que poseen enlaces dobles separados por grupos metileno lo que los hace susceptibles a este asalto (Agarwal *et al.*, 2019; Aitken *et al.*, 2022).

El siguiente evento es la producción de un radical lipídico que puede ser susceptible a una oxidación para formar un radical peroxilo lipídico, finalmente este proceso se propaga y se pueden formar compuestos estables que ponen fin a la reacción como, por ejemplo, malondialdehído (MDA), acroleína y el 4-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). A nivel celular la peroxidación lipídica causa cambios en la estructura, la dinámica y la distribución de la membrana (Agarwal *et al.*, 2019; Aitken *et al.*, 2022; Barati *et al.*, 2020).

El estrés oxidativo también se ha correlacionado fuertemente con el daño al ADN en los espermatozoides, lo que implicaría que reduzcan sus posibilidades de fertilizar o en su defecto que sean responsables de alteraciones genómicas a la siguiente generación (Gualtieri *et al.*, 2021); se sabe que la integridad del ADN se compromete con la fragmentación de una o dos cadenas, lo que puede ocasionar un cambio en la expresión génica, mutaciones puntuales y polimorfismos, las bases nitrogenadas pueden sufrir oxidación y originar el compuesto 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), que afecta la integridad de la cromatina, se ha reportado que en hombres infértiles la cromatina se encuentra mal empaquetada, en comparación a los hombres fértiles (Agarwal *et al.*, 2019; Barati *et al.*, 2020; Evans *et al.*, 2021).

Por otra parte, una elevada concentración de ROS puede activar la vía intrínseca de la apoptosis mediante la desfosforilación de BAD, ocasionando un cambio en la membrana mitocondrial externa con la creación de poros proapoptóticos, además se ha reportado que en hombres infértiles existen mayores concentraciones de citocromo C, caspasa 3 y caspasa 9. Cabe mencionar que también las ROS pueden inducir la vía extrínseca de la apoptosis activando a Fas (Evans *et al.*, 2021). Además, se ha señalado al estrés oxidativo como un factor contribuyente en la reducción de la motilidad (Nowicka-Bauer y Nixon, 2020). También se ha demostrado que una cantidad excesiva de ROS reduce la tasa de fertilización, más aún se ha relacionado con una degeneración embrionaria durante embarazo, lo que podría explicar la pérdida del embrión (Gualtieri *et al.*, 2021). Por otro lado, de Castro y col. (2016) mostraron que espermatozoides de toro expuestos a peróxido

de hidrógeno que se sometieron a técnicas de fertilización *in vitro* disminuyó la tasa de formación de blastocistos.

En cuanto al daño producido por el estrés oxidativo reportado en ovocitos, se sabe que también hay un daño a nivel del ADN, lo que podría relacionarse con aneuploidías cromosomales, la estructura del citoesqueleto, el proceso mitótico y la aceleración de la apoptosis (Lin y Wang, 2021). También se da una peroxidación lipídica que sigue el mismo mecanismo que en el espermatozoide (Peters *et al.*, 2020). Por otro lado, se ha observado que una elevada concentración de ROS en el ambiente folicular propicia una atresia ovárica folicular, aunque de manera fisiológica se lleva a cabo este evento que se caracteriza por la apoptosis de las células de la granulosa y una paulatina pérdida de células de la teca. En modelos animales se ha reportado que hay un aumento en folículos atrésicos, asimismo se observa un aumento de la expresión génica relacionada con la inflamación y la apoptosis, mientras que se ve disminuida la expresión de los genes implicados en la síntesis de esteroides, así como los que tienen actividad antioxidante (Wang *et al.*, 2021).

El estrés oxidativo también altera la fertilización en los ovocitos, mediante la liberación anticipada de ovastacina, que se ubica en el oolema y su función documentada es la escisión de la proteína de la zona pelúcida 2 (ZP2), con ello se evita que los espermatozoides se unan a la ZP (Karmilin *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021). Asimismo, las ROS excesivas causan un daño importante al proteoma del ovocito que tiene repercusiones en la meiosis, la fertilización y el desarrollo embrionario (Peters *et al.*, 2020).

2.4 Cuantificación de ROS

Actualmente existe una amplia variedad de técnicas que permite medir las ROS presentes en células de mamíferos como los ovocitos, espermatozoides y las células de la granulosa, se pueden clasificar en aquellas que hacen la medición de manera directa e indirecta (Agarwal *et al.*, 2019; Evans *et al.*, 2021).

Los métodos que detectan la presencia de ROS de manera directa emplean compuestos que puedan reaccionar con ellas. Entre ellos se encuentra la quimioluminiscencia que se basa en la oxidación de luminol o lucigenina que produce luminiscencia y la respuesta se registra como RLU (unidad relativa de luz) por segundo en base a la concentración de células. La ventaja que presenta esta técnica es que detecta las ROS en su forma H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, de manera intra y extracelular aunado a su alta sensibilidad más de 90% y su especificidad cerca del 70% (Agarwal *et al.*, 2019; Evans *et al.*, 2021). Otro método utilizado ampliamente para la medición de ROS es el uso de una sonda fluorescente como la diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA) esta metodología se sustenta en la habilidad de H_2DCFDA para atravesar la membrana de las células donde se hidroliza y puede ser oxidada por las ROS produciendo el compuesto 2', 7'-diclorofluoresceína fluorescente (DCF) (Yu *et al.*, 2021). Cabe mencionar que detecta la presencia de H_2O_2 , ONOO^- y OH^\cdot de manera intracelular, además la medición se puede realizar por medio de microscopia de fluorescencia y citometría de flujo (Evans *et al.*, 2021). Por mencionar otros métodos directos se puede incluir el ensayo de nitro azul tetrazolio que puede medir ROS intracelular en particular al $\text{O}_2^{\cdot-}$, la cuantificación se realiza en un espectrofotómetro (Agarwal *et al.*, 2019).

Por otra parte, los métodos indirectos son una herramienta para cuantificar ROS,, mediante productos estables y cuantificables debido a la naturaleza transitoria de estas especies, además se puede medir el daño provocado a nivel celular o molecular (Evans *et al.*, 2021; Olowe *et al.*, 2020).

El daño provocado por el estrés oxidativo al ADN se evalúa principalmente con los siguientes ensayos: cometa y TUNEL. El ensayo TUNEL cuantifica los desoxinucleótidos (dUTP) que se incorporan a los extremos 3' libres gracias a una transferasa terminal (TdT), por lo que la fluorescencia producida se relaciona con la fragmentación del ADN y se puede medir mediante citometría de flujo o microscopia de fluorescencia (Agarwal *et al.*, 2021; Evans *et al.*, 2021; Mirzayans y Murray, 2020). Así mismo, el ensayo cometa muestra la fragmentación simple y doble en las cadenas de ADN, para ello se realiza una electroforesis en condiciones neutras o

alcalinas. La visualización de la fragmentación se aprecia en la cola del cometa (Agarwal *et al.*, 2021; Evans *et al.*, 2021).

Dentro de esta clasificación se pueden incluir enzimas participantes en el metabolismo redox como, por ejemplo, SOD, CAT y GPx, en ensayos colorimétricos y en la actualidad existe un abanico de kits comerciales. Existe una variedad de técnicas empleadas en la medición de ROS y se enlistan a continuación; cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS) y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Agarwal *et al.*, 2021; Evans *et al.*, 2021).

2.5 Técnicas de reproducción asistida.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) han ayudado a concebir cerca de 8 millones de bebés en el mundo y siguen innovando para tratar la infertilidad, ayudando a parejas e individuos a formar familias (Fernández *et al.*, 2020; Kanaka *et al.*, 2022). El espectro de las TRA por definición incluye el manejo de gametos y embriones *in vitro* con fines reproductivos (De Geyter, 2019; Fernández *et al.*, 2020). El campo de la medicina reproductiva se ha reinventado a sí misma, desde la década de los 70 y con la introducción de nuevas tecnologías hoy se tiene un abanico de procedimientos como, por ejemplo; inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferencia embrionaria, fecundación *in vitro* (FIV), criopreservación de gametos y embriones, diagnóstico genético preimplantacional (DGP) así como eclosión asistida (De Geyter, 2019; Fernandez *et al.*, 2020; Kanaka *et al.*, 2022). La reproducción médicamente asistida es otro término relacionado denominado que engloba la inseminación intrauterina (IUI) e inducción de la ovulación (Caramaschi *et al.*, 2021; Sarmon *et al.*, 2021). Otro hito que ha impulsado el campo de la medicina reproductiva es la incorporación de la inteligencia artificial (IA) como por ejemplo, la tecnología time lapse, que ayuda a observar y seleccionar a embriones con las mejores características morfológicas para de este modo predecir el éxito de implantación (ESHRE Working group on Time-lapse technology *et al.*, 2020).

A pesar de los grandes avances de la medicina reproductiva la tasa de éxito de las TRA se mantiene en condiciones subóptimas con un impresionante 30 % (Kanaka *et al.*, 2022). Cabe destacar que la tasa de éxito varía enormemente entre clínicas especializadas, por ejemplo, en Europa la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) en EE. UU., señalan que en las mejores clínicas alcanzan hasta un 40 % de nacimientos vivos, pero un factor limitante es la edad materna. De acuerdo con los CDC, en su reporte del 2019 acerca de los ciclos de TRA que se realizan en las clínicas de EE. UU., se muestra que 50.44 % de pacientes menores a 35 años que se sometieron a un ciclo FIV con sus propios óvulos lograron un nacimiento vivo, en contraste con el dramático 7.9 % de las pacientes mayores a 40 años que lograron lo similar (CDC, 2021; Kanaka *et al.*, 2022).

Bajo este contexto, se ha convertido en un objetivo de la medicina reproductiva generar nuevas estrategias que permitan predecir el éxito de las TRA. Por otro lado, las células de cúmulus se presentan como un atractivo modelo para predecir la calidad ovocitaria y la competencia para desarrollar un embrión sano (Turathum *et al.*, 2021). Se sabe que las CC desempeñan varias funciones indispensables para el desarrollo y maduración del ovocito, además mantienen una estrecha comunicación bidireccional que recae parcialmente en las necesidades metabólicas de ambas entidades, en este sentido se vuelve importante el estudio de estas células para construir procedimientos no invasivos que ayuden a reflejar el estado fisiológico del ovocito y al mismo tiempo que sea de ayuda en el pronóstico de la eficacia de los tratamientos de reproducción asistida (Bejarano *et al.*, 2022; Gómez-Torres *et al.*, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

La imposibilidad de concebir un hijo es la realidad para el 15 % de las parejas en edad de procrear. La infertilidad es un importante asunto de salud pública que involucra el estado físico, psicológico, social y económico de los pacientes. Actualmente, la investigación aborda desde diferentes enfoques los mecanismos que median el proceso de fertilización para comprender los factores causantes de la infertilidad. Se ha identificado que uno de los factores que disminuye la fertilidad es el estrés oxidativo debido a las especies reactivas de oxígeno (ROS); aunque forman parte de procesos fisiológicos como la maduración y funcionalidad de los gametos, un desbalance provoca un daño en la calidad del espermatozoide y del ovocito ocasionando que no exista una correcta fertilización. Se creía que para que ocurriera exitosamente este proceso el espermatozoide debía llevar a cabo la reacción acrosomal (RA) en la ZP, pero existen reportes que indican que las CC inducen la RA antes de llegar a la ZP. Con el trabajo de Jin y col. (2011) se demostró que las CC tienen una relevancia fisiológica en la fecundación. Además, las CC están estrechamente implicadas en la maduración del ovocito y suministran moléculas antioxidantes (Turathum *et al.*, 2021; von Mengden *et al.*, 2020). No obstante, la información de cómo se ve afectada la RA del espermatozoide al interactuar con células del cúmulus con estrés oxidativo no ha sido evaluada, por lo que el conocer ésto será de gran ayuda para proporcionar un pronóstico a los tratamientos de reproducción asistida a los que se someten los pacientes y encontrar, junto con el equipo de salud involucrado, la mejor opción en la estrategia además, de aumentar las posibilidades para conseguir un embarazo tomando en consideración que son procedimientos con un gran costo económico.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto pueden tener las especies reactivas de oxígeno presentes en las células del cúmulus sobre la reacción acrosomal en el espermatozoide humano?

5. HIPÓTESIS

El estrés oxidativo inducido en las células del cúmulus altera su mecanismo antioxidante atenuando la reacción acrosomal en el espermatozoide humano.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar el efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre la interacción de las células del cúmulus con la reacción acrosomal en el espermatozoide humano.

6.2 Objetivos específicos

- Evaluar la presencia de las especies reactivas de oxígeno en las células del cúmulus.
- Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes en las células del cúmulus bajo estrés oxidativo.
- Evaluar el porcentaje de la reacción acrosomal en el espermatozoide después de su interacción con las células del cúmulus bajo estrés oxidativo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales

7.1.1 Reactivos

Para este estudio se utilizó medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, por sus siglas en inglés) para mantener en cultivo a las células del cúmulus debido a que sus componentes favorecen la viabilidad de estas células. Del mismo modo se empleó buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) para lavar las células. Además, para la preparación y purificación de los espermatozoides se empleó el reactivo PureSperm 100 de Nidacon; también se utilizó albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) y medio HTF (Human Tubal Fluid, por sus siglas en inglés) para su capacitación. Por otro lado, para evaluar la capacidad fertilizante del espermatozoide se empleó la tinción con aglutinina de *Pisum sativum* conjugada con FITC (PSA-FITC), además de progesterona como inductor de la reacción, y finalmente para inducir el estrés oxidativo se utilizó peróxido de hidrógeno.

7.1.2 Recolección de muestra de células del cúmulus.

Las células del cúmulus fueron obtenidas de pacientes de entre 26 a 35 años que acudieron a la clínica de fertilidad INSEFER y se sometieron a un protocolo de estimulación ovárica para la obtención de ovocitos, mediante la punción de folículos para un procedimiento de reproducción asistida mediante la técnica ICSI. Se excluyó a las pacientes que padecían endometriosis, síndrome de ovario poliquístico y enfermedades de transmisión sexual. Las células de la granulosa se retiraron por microdissección con agujas estériles de insulina y no tuvieron participación en el tratamiento de fertilidad, acción que fueron realizada por un embriólogo experimentado.

Se utilizó la muestra biológica de 13 participantes. Por otro lado, la invitación a participar en este estudio se hizo de manera verbal con las pacientes que acudieron el día de su procedimiento para su tratamiento de infertilidad. Para la inactivación de las muestras biológicas se usó una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante una hora, para su posterior disposición como residuo peligroso biológico

infeccioso (RPBI) de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-087-ECOL-SSA1-2002) .

7.1.3 Recolección de muestra de semen.

Se solicitó la participación de hombres de 18 a 45 años, sanos con normozoospermia, es decir, con parámetros normales de acuerdo con la OMS. Se les pidió que cumplieran con 48 horas de abstinencia sexual y se excluyó aquellos que refirieron haber consumido algún tipo de medicamento o padecer alguna enfermedad crónico-degenerativa y de transmisión sexual, además de aquellos que se habían realizado la vasectomía, así como aquellos participantes que no firmaron el consentimiento informado. La muestra se recogió en un frasco estéril y se analizó en un periodo de 1 hora permitiendo la licuefacción de la muestra (World Health Organization, 2010).

Se utilizó la muestra biológica de 13 participantes. Por otro lado, La invitación a participar en este estudio se realizó por medio de un folleto que fue distribuido mediante redes sociales (anexo 1). Para la inactivación de las muestras biológicas se usó una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante una hora para su posterior disposición como residuo peligroso biológico infeccioso (RPBI) de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

7.1.4 Consideraciones éticas

La realización experimental de esta investigación utilizó muestras biológicas de semen y células del cúmulus obtenidas de sujetos humanos, cabe destacar que las muestras solo fueron empleadas en este estudio y no se utilizaron con fines reproductivos ni fueron criopreservadas. A cada participante que aceptó la invitación, se le explicó de manera clara y detallada la finalidad, los beneficios o falta de ellos que obtuvo al ser parte de manera anónima en este trabajo. Y para ello firmaron el consentimiento informado correspondiente, el anexo 2, corresponde a la participación de sujetos masculinos (Díaz Martel, 2021) y el anexo 3 a la participación de sujetos femeninos.

7. 2 Desarrollo experimental

7.2.1 Aislamiento de células del cúmulus.

Posterior a la recolección de las células del cúmulus se hicieron dos lavados con PBS 1X seguido de centrifugación a 265 g durante 5 min como lo describe X. Lin y col. 2020. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 100 μ L de tripsina-EDTA 0.25% posteriormente se dejó incubando 3 minutos a 37°C (Cecchino *et al.*, 2021); a continuación, se adicionaron 900 μ L de medio de cultivo DMEM con 10 kU/mL de penicilina y 10 kU/mL de estreptomycin y L-glutamina 4 mM. La suspensión celular se hizo con azul de tripano 0.04 % para observar la vitalidad de las células y se realizó un conteo con un hemocitómetro para colocar aproximadamente 50, 000 células en un microtubo de 2 mL, que se conservó en una atmosfera de 5 % CO₂ a 37°C, como lo describe Chermuła y col. (2020).

7.2.2 Inducción de estrés oxidativo en células del cúmulus.

Para inducir estrés oxidativo, se trataron 50,000 células con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a diferentes concentraciones (0, 20, 80,160 y 300 μ M) durante 2 horas (Lin *et al.*,2020 y X. Wang *et al.*,2019). Se reservó una parte para evaluar el nivel de progesterona con ayuda de un kit comercial, la cuantificación de ROS y la evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes.

7.2.3 Cuantificación de ROS en células del cúmulus.

La cuantificación intracelular de ROS en las células del cúmulus se realizó con la sonda H₂-DCFDA (di-acetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína). Para ello se suspendieron las células en PBS 1X y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 25 minutos, en 10 μ M H₂-DCFDA. Finalmente se hizo un lavado con PBS 1X, el botón recuperado se resuspendió en 1 mL de PBS 1X. La suspensión celular se analizó mediante citometría de flujo evaluando 10, 000 eventos a una longitud de onda de excitación 488 nm y una onda de emisión de 525 nm (Gong *et al.*, 2020). También se emplearon kits comerciales para la cuantificación de la actividad de la súper óxido dismutasa (SOD), GSH-peroxidasa (GSH-Px) y la catalasa (CAT) mediante ensayos colorimétricos (Agarwal *et al.*, 2021).

7.2.4 Preparación y capacitación de espermatozoides.

Se realizó el examen macroscópico y microscópico de la muestra de semen, siguiendo los parámetros que indica la OMS en el manual para el análisis de semen. El análisis macroscópico consistió en la medición de pH, volumen, color y viscosidad. Por otro lado, en la segunda fracción se analizaron factores como la concentración y la movilidad de los espermatozoides con ayuda de una cámara Makler en un microscopio óptico a 40x y la morfología se valoró en frotis con tinción Diff-Quik y se visualizó con ayuda de aceite de inmersión a 100x (World Health Organization, 2010).

Se continuó con un lavado mediante un gradiente discontinuo de PureSperm 100 al cual se le agregó la muestra y se centrifugó a 230 g durante 10 minutos, se tomó la pastilla formada tratando de no recuperar de las otras fases y se pasó a un tubo con 1 mL de medio HTF suplementado con albúmina 10 % para una segunda centrifugación a 265 g durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL además se tomó una alícuota de 10 μ L para determinar la concentración en la cámara Makler. Finalmente, se incubó durante 3 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ 6 % (Sun *et al.*, 2021).

7.2.6 Interacción células del cúmulus con espermatozoides.

Las células del cúmulus previamente estresadas con peróxido de hidrógeno se lavaron con 500 μ L de PBS a 265 g durante 5 minutos. Después se resuspendieron en 500 μ L de medio DMEM, posteriormente se inseminó cada tubo con aproximadamente 1.5×10^6 espermatozoides previamente capacitados y se dejaron incubar a 37 °C y 6 % CO₂ durante 17 horas (Gómez-Torres *et al.*, 2015; J. Park *et al.*, 2021). Finalmente se centrifugó a 230 g durante 5 minutos, el botón obtenido con espermatozoides fue utilizado para evaluar la RA (Gómez-Torres *et al.*, 2015).

7.2.7 Evaluación de la reacción acrosomal.

Después de la incubación con las células del cúmulus se recuperaron los espermatozoides para agregar 100 μ L de metanol frío y colocar en hielo durante 1

minuto. Posteriormente, se colocó una alícuota de 50 μ L en un portaobjetos para realizar un frotis y se dejó secar a 37 °C. El siguiente paso consistió en extender en el frotis 10 μ L de PSA-FITC a una concentración 25 mg/mL, se dejó en una cámara húmeda durante 25 minutos en un cuarto oscuro (Gómez-Torres *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2021).

Por otro lado, se preparó un control positivo y uno negativo que se mantuvieron en las mismas condiciones que las muestras de interacción. El control positivo tenía una alícuota de espermatozoides y progesterona (10 μ M), el control negativo solo contenía espermatozoides. Finalmente, se contaron 200 espermatozoides en un microscopio de epifluorescencia a una longitud de onda de excitación 488 nm y una onda de emisión de 525 nm para estimar el porcentaje de reacción acrosomal obtenida (Castillo *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2021).

7.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 9, mostrándose la media \pm error estándar para representar los datos de los experimentos realizados con una $p < 0.05$ para diferencias significativas. Además, se utilizó la prueba ANOVA una y dos vías, con las pruebas *post hoc* de Tukey y Dunnett. Por otro lado, se utilizó el software FlowJo v10.9.0 para analizar los datos obtenidos mediante citometría de flujo. Y finalmente se utilizó la correlación de Pearson con una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 El H₂O₂ altera la reacción acrosomal en el espermatozoide humano.

Se evaluó el efecto del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) exógeno en la reacción acrosomal (RA) de los espermatozoides humanos, para ello se emplearon espermatozoides previamente capacitados y se incubaron durante 1 hora a 37° C y 6% CO₂ con concentraciones crecientes de H₂O₂ en presencia (inducida) o ausencia (espontánea) de progesterona (P4, 10 μM) como inductor de la RA recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En la figura 6 se muestra que la RA espontánea aumenta significativamente a partir de 50 μM y la mayor respuesta se presenta a 300 μM; contrario a lo que se exhibe en la RA inducida, donde se observa un decremento de la RA mientras aumenta la concentración de H₂O₂ con diferencia estadística (Figura 6).

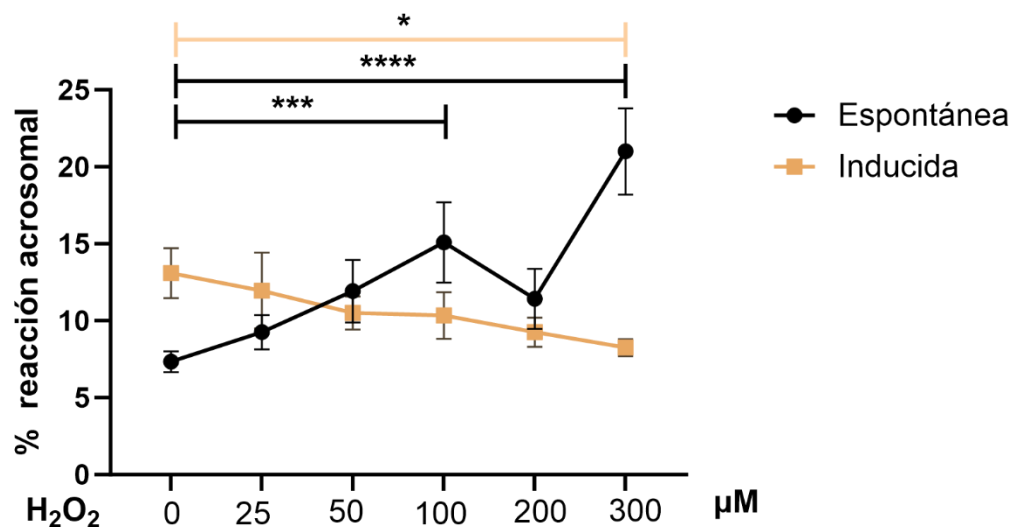
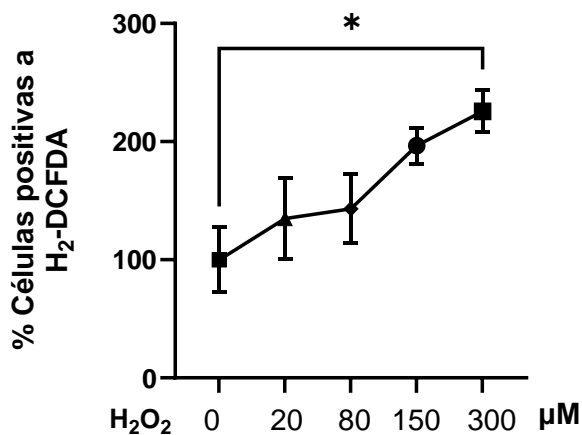


Figura 6. El peróxido de hidrógeno altera la reacción acrosomal. Se muestra el porcentaje de reacción acrosomal de espermatozoides capacitados 3 h a 37°C y 6% CO₂ con (inducida) y sin (espontánea) progesterona (10 μM). Los valores se representan como media ± SEM. Se analizó por ANOVA dos vías y la prueba *post hoc* Dunnett **** p < 0.0001, *** p < 0.0001, *p < 0.05, n=6.

8.2 El H₂O₂ induce estrés oxidativo en células del cúmulus.

Se indujo estrés oxidativo en las células del cúmulus (CC) mediante la adición creciente de H₂O₂ durante 2 horas a 37 °C y 6 % CO₂, y corroborarlo se evaluaron los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCFDA) para cada concentración de H₂O₂. Las mediciones mostradas en las figuras 7A y 7B, presentan un aumento significativo en el porcentaje de células positivas a H₂-DCFDA en las CC tratadas con 300 μM de H₂O₂ en comparación con las células control.

A



B

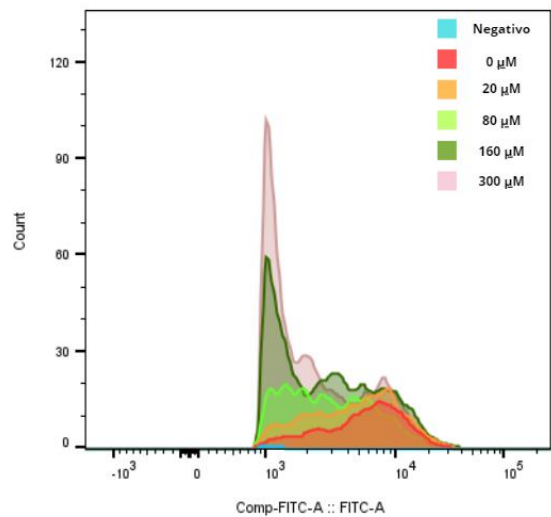


Figura 7. El H₂O₂ aumenta las ROS en las células del cúmulus. A. Se evaluaron las especies reactivas de oxígeno intracelulares en células del cumulus tras 2 h de tratamiento con H₂O₂. B. Histogramas obtenidos por citometría de flujo para células positivas a H₂-DCFDA. Los datos se representan como media ± SEM, analizados con ANOVA una vía con Dunnett como prueba *post hoc* **p*< 0.05, n=5.

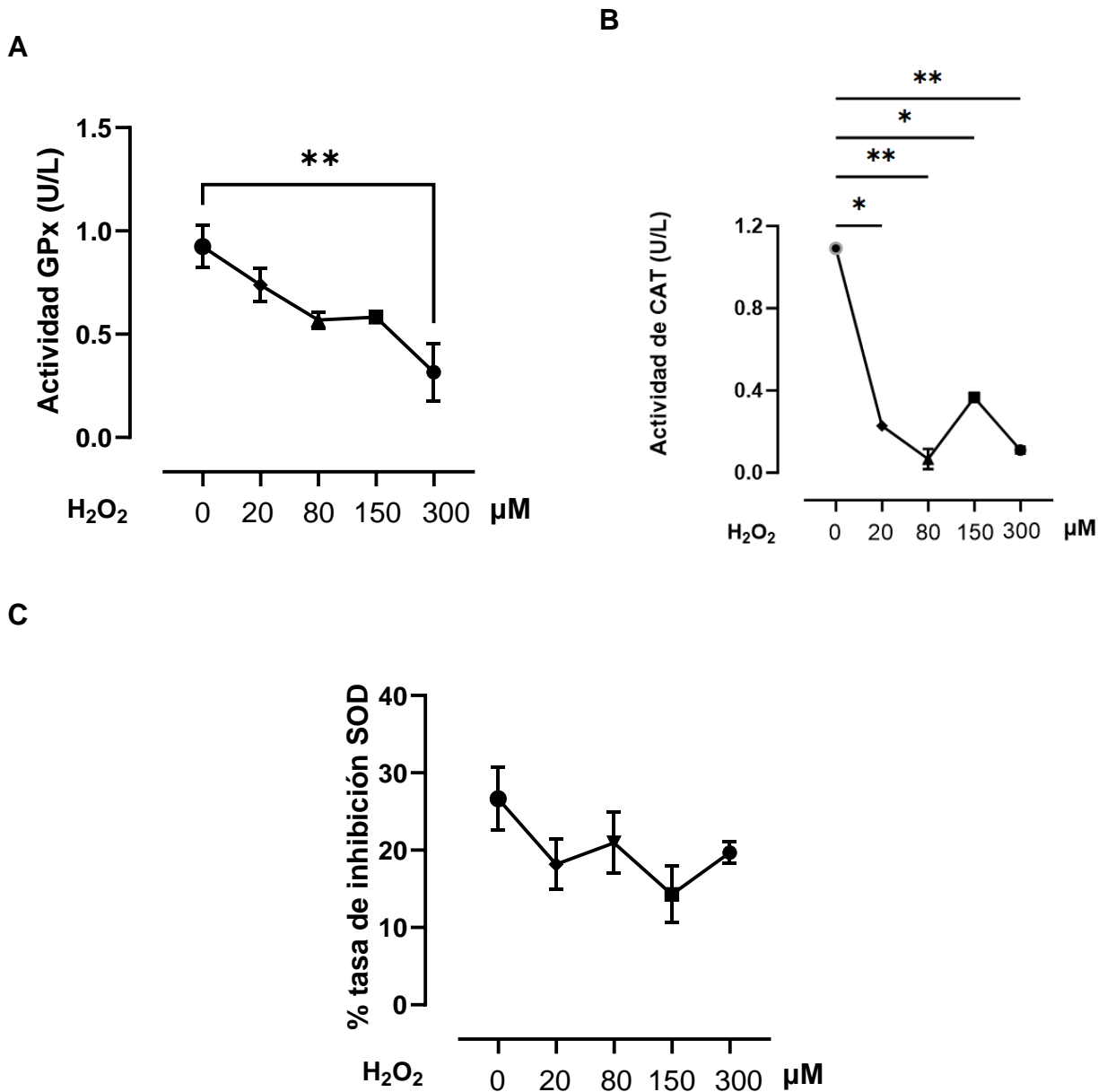


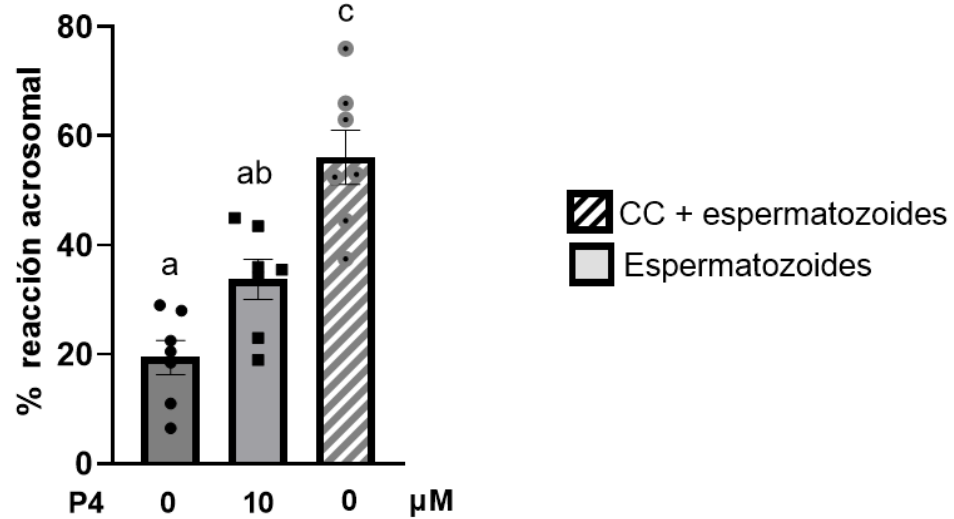
Figura 8. Sistema antioxidante en las células del cúmulus. Se evaluó la actividad enzimática del superóxido dismutasa (SOD), glutati6n peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) en células del cúmulus después de 2 h de tratamiento con peróxido de hidrógeno. Se representan los datos como la media \pm SEM, se analizaron con ANOVA una vía y prueba *post hoc* Dunnett. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$, $n=3$.

Con el propósito de evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes en las CC bajo estrés oxidativo se utilizaron kits comerciales basados en métodos colorimétricos. Los resultados de la figura 8A muestran una disminución significativa en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) comparando las CC de un estado basal (0.924 ± 0.102 U/L) a las CC tratadas con la máxima concentración de H_2O_2 (0.316 ± 0.139 U/L); en la actividad de la catalasa (CAT), se aprecia en la figura 8B que existe una tendencia a la baja en la actividad de la enzima a partir de $20 \mu M$ de H_2O_2 y se observó una diferencia significativa. En cuanto a la respuesta del superóxido dismutasa (SOD) presentó un ligero decremento en su actividad comparando las CC control con las CC tratadas a concentraciones crecientes de H_2O_2 , sin embargo, no existe una diferencia significativa (Figura 8C).

8.3 Las células del cúmulus inducen la reacción acrosomal en el espermatozoide humano.

Para evaluar la funcionalidad del espermatozoide en interacción con las células del cúmulus (CC), se cuantificó el porcentaje de la reacción acrosomal (RA) con la tinción PSA- FITC después de mantener en suspensión a ambas células durante 17 horas a $37 \text{ }^\circ C$ en medio DMEM. En la figura 9B se muestra que las CC significativamente aumentan el porcentaje de RA. Cuantitativamente, las CC inducen un $56.07 \pm 4.98 \%$ de RA en comparación con el $19.43 \pm 3.14 \%$ observado en espermatozoides incubados solo en medio de cultivo (Figura 9A). Asimismo, las CC exhiben un aumento significativo de la RA a comparación del grupo de espermatozoides a los cuales se les añadió progesterona (P4, $10 \mu M$), como inductor fisiológico recomendado por la Organización Mundial de Salud. En conjunto estos datos demuestran que las células del cúmulus son inductoras de la reacción acrosomal.

A



B

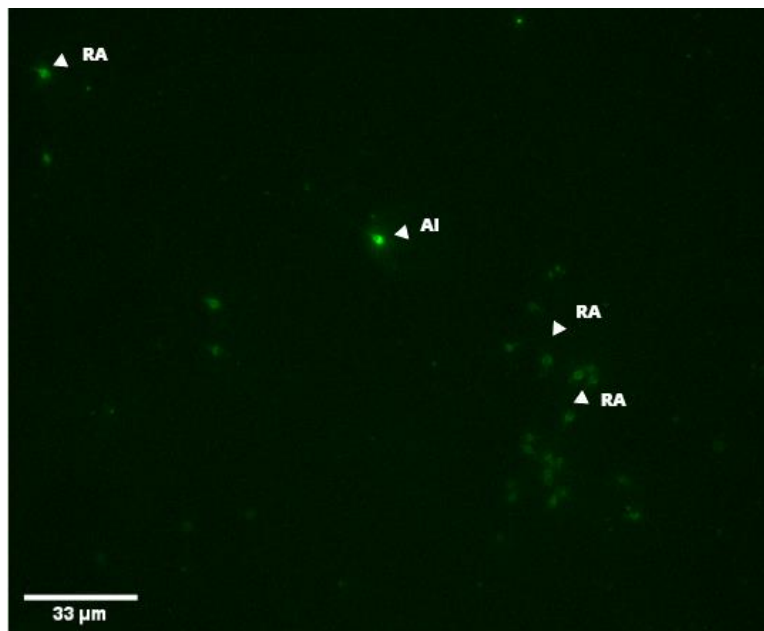
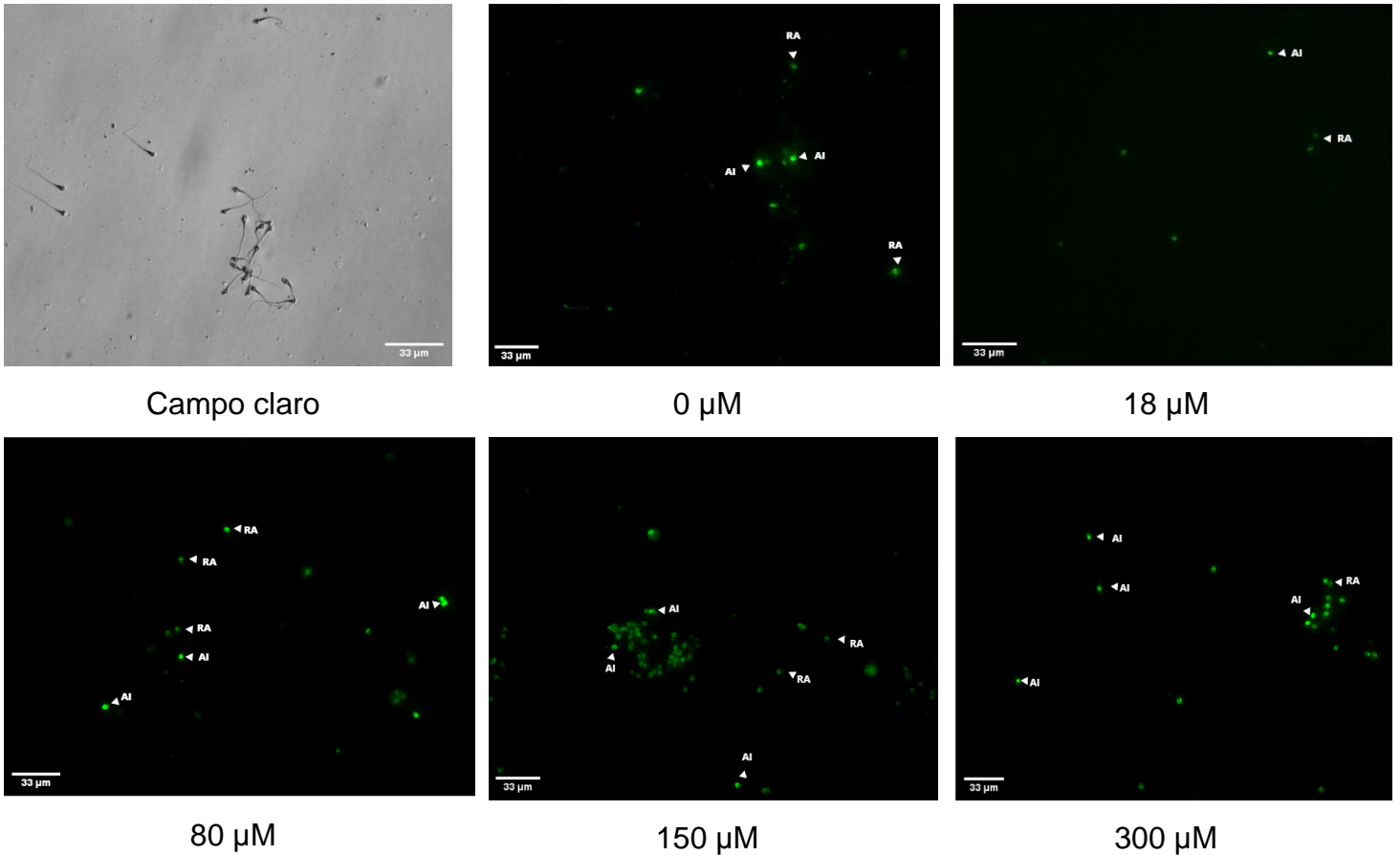


Figura 9. Las células del cúmulus son inductoras de la reacción acrosomal. A. Se evaluó la reacción acrosomal después de 17 h a 37 °C y 6 % CO₂ en espermatozoides que estuvieron en interacción entre las células del cúmulus. Se indujo la reacción acrosomal con progesterona (P4, 10μM). B. Imagen representativa de la evaluación de la reacción acrosomal (AR) y espermatozoides con acrosoma intacto (AI). Se representan los datos como la media ± SEM, se analizaron con ANOVA una vía y *post hoc* Tukey. Las letras b y c indican diferencia $p < 0.05$, $n=14$.

8.4 El estrés oxidativo en células del cúmulus inhibe la reacción acrosomal en espermatozoide humano.

Para determinar el efecto del estrés oxidativo en las capas externas del ovocito con la capacidad fertilizante del espermatozoide humano, se emplearon diferentes concentraciones de H_2O_2 para inducir estrés oxidativo en las CC y se incubaron con espermatozoides durante 17 horas para realizar la evaluación de la RA. En la figura 10A, se muestra que el estrés oxidativo inducido en las CC suprime de manera dosis dependiente la RA. La cuantificación reveló que con $300 \mu M$ de H_2O_2 se inhibe significativamente ($22.42 \pm 3.69 \%$) la RA a comparación al grupo control ($56.07 \pm 4.98 \%$) (Figura 10B). Estos resultados sugieren que las especies reactivas de oxígeno alteran la capacidad de inducir la RA de las células del cúmulus.

A



B

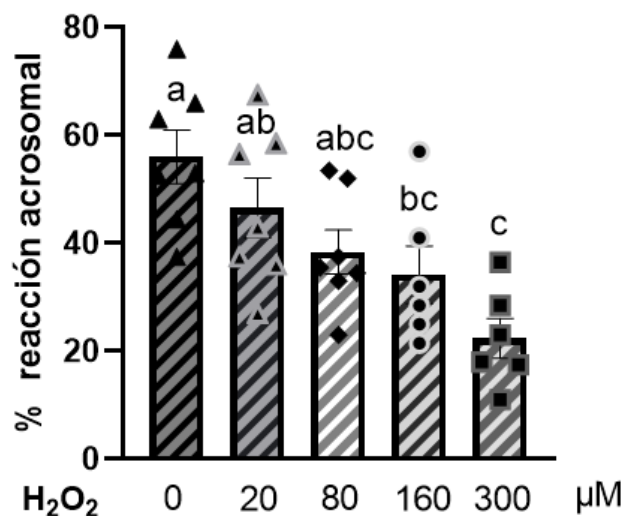


Figura 10. El estrés oxidativo en células del cúmulus inhibe la reacción acrosomal. A. Imágenes representativas de la de la evaluación de la reacción acrosomal (AR) y espermatozoides con acrosoma intacto (AI). B. Se evaluó la reacción acrosomal después de 17 h a 37 °C y 6 % CO₂ en espermatozoides que estuvieron en interacción con las células del cúmulus. Se representan los datos como la media ± SEM, se analizaron con ANOVA una vía y *post hoc* Tukey, las letras a, b y c indican diferencias significativas ($p < 0.05$), $n=14$.

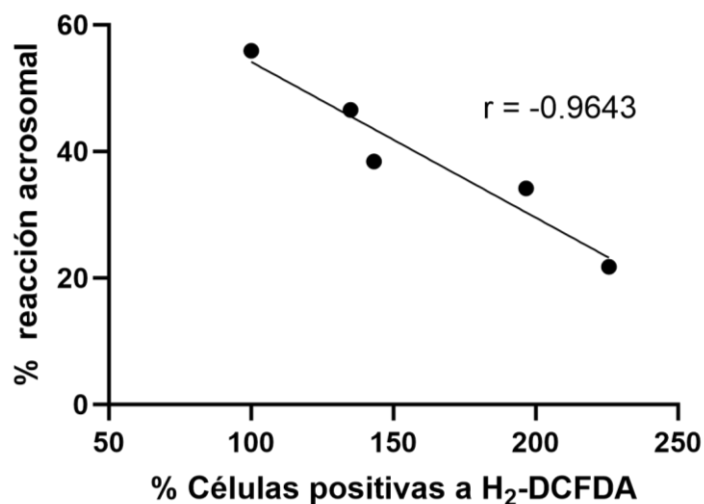


Figura 11. Correlación entre las especies reactivas de oxígeno en células del cúmulus y la reacción acrosomal en el espermatozoide humano. Se evaluó el porcentaje de células del cúmulus positivas a H₂-DCFDA vs la reacción acrosomal en espermatozoide humano después de 17 h de interacción. Se representan los datos como la media y se analizaron con una correlación de Pearson, * $p < 0.05$.

Por otro lado, para determinar la correlación que pudiera existir entre las CC bajo estrés oxidativo con la RA en el espermatozoide humano, se realizó una correlación de Pearson ($p < 0.05$). En la figura 11, se muestra que existe una correlación negativa entre ambas variables analizadas, es decir, mientras aumenta el porcentaje de células positivas a H₂-DCFDA disminuye el porcentaje de RA y viceversa.

8.4 Efecto del estrés oxidativo en células del cúmulus sobre la secreción de progesterona.

Con los datos anteriores, se buscó corroborar que las ROS también comprometen la secreción de hormonas en las CC. Para ello, se empleó un kit comercial para cuantificar la progesterona (P4) mediante el método ELISA. En la figura 12 se muestra una tendencia a la baja en la concentración de P4 en comparación con las CC control que presentaron 473.3 ± 125.2 pg/mL y las CC con la máxima concentración de H₂O₂ (182.5 ± 45.19 pg/mL), no obstante, no existe diferencia significativa entre grupos.

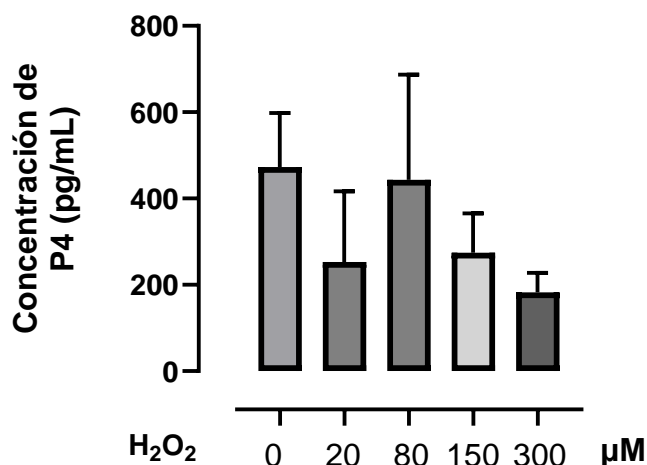


Figura 12. Efecto del estrés oxidativo en células del cúmulus sobre la secreción de progesterona. Se evaluó la concentración de progesterona (P4) en las células del cúmulus tratadas a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno. Los datos se representan como la media \pm SEM y se analizaron con ANOVA una vía y *post hoc* Tukey, $n=3$.

9. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la interacción de las células del cúmulus (CC) con la reacción acrosomal (RA) en el espermatozoide humano. Se proporcionó evidencia de que las CC son inductoras de la RA en el espermatozoide humano. En particular, se demostró que las ROS inhiben la capacidad de las CC para inducir la RA en el espermatozoide humano y se correlacionan de manera negativa con la funcionalidad del espermatozoide, alteran el balance redox así como la secreción de progesterona.

Como primer paso en esta investigación se evaluó la RA en espermatozoides humanos con concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Consistente con lo reportado anteriormente, se encontró que aumentó la RA espontánea por efecto de H_2O_2 exógeno a partir de $50 \mu M$ (Moreno-Irusta *et al.*, 2020; Rivlin *et al.*, 2004). El mecanismo por el cual actúa el H_2O_2 , siendo una molécula permeable a la membrana, es mediante la vía AMPc/ PKA (adenosín monofosfato cíclico/ proteína cinasa A), al activarse PKA se incrementa la fosforilación de tirosina, este paso es esencial para que ocurra la capacitación, reportes previos señalan que existe una disminución de la fosforilación de la tirosina en gametos de hombres infértiles (Castillo *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021; Otasevic *et al.*, 2020; Rivlin *et al.*, 2004). Por otro lado, el H_2O_2 estimula un aumento en el flujo de Ca^{2+} intracelular posiblemente mediante el canal TRPV1, implicado en el potencial de fecundar del espermatozoide, además se ha demostrado que especialmente modula las funciones dependientes de Ca^{2+} como lo es la RA (Swain *et al.*, 2022). También se propone que al estar expuesto a altas concentraciones de H_2O_2 ($> 200 \mu M$) el efecto que se observa sea debido a la estimulación de la peroxidación lipídica por el estrés oxidativo (EO) inducido en los gametos masculinos, siendo la membrana del espermatozoide rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que son susceptibles al ataque de las ROS, se puede facilitar la salida de las enzimas hidrolíticas ocasionando la RA espontánea (Barati *et al.*, 2020; Otasevic *et al.*, 2020). En la RA inducida por progesterona, se observa que existe un cambio significativo en respuesta a altas concentraciones de H_2O_2 , una posibilidad es que

al inducir EO en los espermatozoides, el H₂O₂ promueve modificaciones proteicas que alteran la capacidad fertilizante del espermatozoide, en estudios previos se indica que las ROS aumentan la nitración de tirosina y la S-glutacionilación que modifica la capacitación en gametos masculinos humanos (Morielli y O'Flaherty, 2015). Reportes anteriores sugieren que la exposición a H₂O₂ propicia la generación de ROS adicionales, acción que esta mediada por la enzima NOX5 (NADPH oxidasa 5), además un aumento en la expresión de NOX5, se ha relacionado con problemas de infertilidad en hombres (Aitken y Baker, 2020).

También se utilizó el modelo de las CC para evaluar el impacto de las ROS en la funcionalidad del espermatozoide, para ello se agregaron concentraciones crecientes de H₂O₂ como inductor de EO celular (Luo *et al.*, 2020). La evaluación por citometría de flujo con la sonda fluorescente H₂-DCFDA, reveló que las ROS intracelulares aumentaron de manera significativa. Los resultados obtenidos son similares con lo reportado anteriormente lográndose inducir EO en las CC (X. Lin *et al.*, 2020b; Shen *et al.*, 2018; Zhai *et al.*, 2023). En el ambiente folicular, las CC son la principal defensa antioxidante del ovocito, cuando se pierde el balance entre las ROS y la actividad antioxidante de las células se promueve un estado de EO, siendo responsable de múltiples daños que alteran la función y la estructura de las CC (Peters *et al.*, 2020; von Mengden *et al.*, 2020; Wyse *et al.*, 2020). Más allá del daño celular, el daño oxidativo afecta la fertilidad femenina, la cual disminuye la calidad y la cantidad de ovocitos, también se pueden manifestar enfermedades como lo es el síndrome de ovario poliquístico, endometriosis, disfunción ovárica y cáncer, comprometiendo aún más la fertilidad femenina (Liang *et al.*, 2023).

Para contrarrestar el daño ocasionado por el EO las CC poseen un sistema de defensa antioxidante principalmente de origen enzimático como el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). En este estudio se evaluó la actividad de estas tres enzimas, encontramos que las actividades de la GPx y CAT disminuyen significativamente ($p < 0.05$) en CC tratadas con 300 μ M de H₂O₂, comparada con las CC control; por otro lado, de manera interesante no se apreciaron diferencias significativas en la actividad de SOD, no obstante, se muestra una disminución de la actividad enzimática respecto al control. En el pasado se ha

reportado que existe una disminución en la actividad enzimática antioxidante en el síndrome de ovario poliquístico (SOP) y en una edad materna avanzada (Liang *et al.*, 2023; Masjedi *et al.*, 2020). También se ha relacionado la defensa de las enzimas antioxidantes con el éxito de las técnicas de reproducción asistida (TRA), en especial se correlaciona la actividad de SOD con una mayor tasa de formación de blastocistos de calidad y por lo tanto una mayor probabilidad de lograr un embarazo contrario a lo observado en pacientes con una baja actividad de SOD (Matos *et al.*, 2009; Von Mengden *et al.*, 2022). Por otro lado, bajos niveles de GPx también se ha reportado en células de la granulosa en pacientes con SOP y aquellas con infertilidad no explicada, también cabe destacar que en mujeres jóvenes la actividad de GPx es significativamente mayor que en mujeres de edad avanzada (Masjedi *et al.*, 2020; Von Mengden *et al.*, 2022). En cuanto a CAT, también se ha documentado que su actividad depende de la edad de las pacientes así, como los protocolos de estimulación ovárica a los que son sometidas previamente a un tratamiento de TRA (Von Mengden *et al.*, 2022). En conjunto con los resultados obtenidos en este trabajo, se refuerza la idea de implementar terapia antioxidante a las mujeres que estén previas a someterse a un tratamiento de TRA o aquellas que sufren que SOP y endometriosis, se han probado una gran variedad de moléculas que ayuden a incrementar la defensa antioxidante de las células de la granulosa y CC con resultados prometedores como por ejemplo; la melatonina, la vitamina D, la genisteína, el resveratrol y la curcumina por mencionar algunas (Luo *et al.*, 2020; Masjedi *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

Otro punto importante en este trabajo fue corroborar que las CC son inductoras de la RA, los resultados obtenidos indican que las CC promueven de manera significativa ($p < 0.05$) la inducción de la RA. Lo anterior, concuerda con lo reportado por otros autores (Hong *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2011). La evidencia señala que los espermatozoides experimentan la RA al atravesar las CC y se debe a que son células esteroideogénicas, es decir, son activas secretoras de progesterona (P4) además de diferentes moléculas como, por ejemplo; quimiocinas, moléculas de señalización, prostaglandinas, ARN no codificantes y péptidos similares al EGF (Kato *et al.*, 2022; Prajapati *et al.*, 2022; Y. Xu *et al.*, 2022). La progesterona, es la molécula más estudiada, actúa como reguladora de la función espermática a través

de diversas vías, por ejemplo, promueve la fosforilación de la proteína Hsp90 además del canal de calcio CatSper, ambos son de gran importancia en los procesos de capacitación, hiperactivación y RA, se ha demostrado que inhibiendo estos dos blancos moleculares se inhibe la capacidad del espermatozoide de fertilizar (Jiang *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2021). De manera similar, la P4 secretada por las CC propicia la RA activando al receptor de superficie celular NYD-SP8 el cual desencadena una movilización de Ca^{2+} , importante modulador de la RA (Turathum *et al.*, 2021).

Puntualmente este trabajo se centró en evaluar la funcionalidad del espermatozoide con la interacción de las CC bajo EO. Se encontró que la RA de espermatozoides sin EO disminuye significativamente ($p < 0.05$) cuando están en contacto con CC previamente tratadas con H_2O_2 , hasta el momento es el primer reporte que existe de esta clase. Además, se evaluó la concentración de P4 en CC previamente estresadas con H_2O_2 . De manera consistente con otro reportes se observa que al inducir EO con H_2O_2 reprime la síntesis de progesterona y posee una actividad anti-esteroidogénica, el mecanismo sugerido es mediante el bloqueo de la actividad de Hsd3b1, una enzima clave en la esteroidogénesis, además, de limitar el transporte de colesterol a la mitocondria (Zaidi *et al.*, 2021) y de esta manera inhibiendo la RA en los espermatozoides. Cabe destacar que en la clínica se observa que las pacientes que padecen síndrome de ovario poliquístico, una patología relacionada con EO e infertilidad, las CC producen cantidades casi nulas de progesterona (Masjedi *et al.*, 2020).

Por otro lado, en este estudio se reporta una correlación negativa entre las ROS producidas por la inducción de EO en CC y la RA de espermatozoides que estuvieron en contacto con ellas. Se ha evidenciado ampliamente que las CC son un modelo atractivo por brindar nuevas perspectivas para entender mejor enfermedades y por supuesto de ayuda en la medicina reproductiva (Matos *et al.*, 2009; Russo *et al.*, 2022). Su atractivo recae principalmente por su cercanía con el ovocito y el diálogo derivado de sus necesidades metabólicas posicionando a las CC como una ventana a la calidad ovocitaria (Da Luz *et al.*, 2022). Además, es ampliamente aceptado que un exceso de ROS contribuye en patologías

relacionadas con infertilidad en hombres y mujeres (Da Luz et al., 2022; X. Lin et al., 2020b; Moreno-Irusta et al., 2020). Por otro lado, el éxito de las TRA también se ve influenciado por un desbalance de ROS, se ha reportado un estado de EO en pacientes con una edad avanzada que se someten a tratamientos de TRA, traduciéndose en una menor calidad ovocitaria que puede relacionarse con una menor tasa de formación de blastocisto, menores tasas de implantación y una mayor probabilidad de sufrir una pérdida gestacional temprana (Mauchart *et al.*, 2023). Por estos motivos, existe la urgencia de implementar terapias antioxidantes en las parejas e individuos que busquen iniciar un tratamiento mediante TRA con la intención de aumentar sus probabilidades de conseguir un embarazo.

10. CONCLUSIÓN

En conclusión, se proporcionó evidencia de que las células del cúmulus (CC) inducen la reacción acrosomal (RA) en el espermatozoide humano. Se demostró que las especies reactivas de oxígeno (ROS) inhiben la capacidad de las CC para inducir la RA en el gameto masculino humano, también se observó que las ROS alteran el balance redox de las CC, así como la secreción de progesterona y se correlacionan de manera negativa con la funcionalidad del espermatozoide. Podría investigarse a futuro como la terapia antioxidante puede ayudar a restaurar la capacidad de las CC para inducir RA para optimizar los tratamientos de reproducción asistida.

11. REFERENCIAS

- Agarwal, A., Henkel, R., & Majzoub, A. (Eds.). (2021). *Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction* (1.^a ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108878715>
- Agarwal, A., Henkel, R., & Samanta, L. (2019). *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-03860-3>
- Agarwal, A., Maldonado Rosas, I., Anagnostopoulou, C., Cannarella, R., Boitrelle, F., Munoz, L. V., Finelli, R., Durairajanayagam, D., Henkel, R., & Saleh, R. (2022). Oxidative Stress and Assisted Reproduction: A Comprehensive Review of Its Pathophysiological Role and Strategies for Optimizing Embryo Culture Environment. *Antioxidants*, 11(3), 477. <https://doi.org/10.3390/antiox11030477>
- Aitken, R. J. (2020). Impact of oxidative stress on male and female germ cells: Implications for fertility. *Reproduction*, 159(4), R189-R201. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0452>
- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2020). The Role of Genetics and Oxidative Stress in the Etiology of Male Infertility—A Unifying Hypothesis? *Frontiers in Endocrinology*, 11, 581838. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.581838>
- Aitken, R. J., Drevet, J. R., Moazamian, A., & Gharagozloo, P. (2022). Male Infertility and Oxidative Stress: A Focus on the Underlying Mechanisms. *Antioxidants*, 11(2), 306. <https://doi.org/10.3390/antiox11020306>
- Aldana, A., Carneiro, J., Martínez-Mekler, G., & Darszon, A. (2021). Discrete Dynamic Model of the Mammalian Sperm Acrosome Reaction: The Influence

- of Acrosomal pH and Physiological Heterogeneity. *Frontiers in Physiology*, 12, 682790. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.682790>
- Almansa-Ordóñez, A., Bellido, R., Vassena, R., Barragan, M., & Zambelli, F. (2020). Oxidative Stress in Reproduction: A Mitochondrial Perspective. *Biology*, 9(9), 269. <https://doi.org/10.3390/biology9090269>
- Alves, M. B. R., Celeghini, E. C. C., & Belleannée, C. (2020). From Sperm Motility to Sperm-Borne microRNA Signatures: New Approaches to Predict Male Fertility Potential. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 791. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00791>
- Andronico, F., Battaglia, R., Ragusa, M., Barbagallo, D., Purrello, M., & Di Pietro, C. (2019). Extracellular Vesicles in Human Oogenesis and Implantation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2162. <https://doi.org/10.3390/ijms20092162>
- Balestrini, P. A., Jabłoński, M., Schiavi-Ehrenhaus, L. J., Marín-Briggiler, C. I., Sánchez-Cárdenas, C., Darszon, A., Krapf, D., & Buffone, M. G. (2020). Seeing is believing: Current methods to observe sperm acrosomal exocytosis in real time. *Molecular Reproduction and Development*, 87(12), 1188-1198. <https://doi.org/10.1002/mrd.23431>
- Barati, E., Nikzad, H., & Karimian, M. (2020). Oxidative stress and male infertility: Current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(1), 93-113. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03253-8>
- Bejarano, I., Dorado-Silva, M., Sarmiento-Soto, H., Álvarez-Sánchez, N., Lardone, P. J., Guerrero, J. M., Sánchez-Martín, P., & Carrillo-Vico, A. (2022). GPX3

Overexpression in Cumulus Cells Entails a Poor Prognosis for Uterine Implantation of Morphotype A Embryos. *Biology*, 11(9), 1361.
<https://doi.org/10.3390/biology11091361>

Bellver, J., & Donnez, J. (2019). Introduction: Infertility etiology and offspring health. *Fertility and Sterility*, 111(6), 1033-1035.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.043>

Bjørklund, G., Peana, M., Maes, M., Dadar, M., & Severin, B. (2021). The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 120, 470-478.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.10.004>

Bosch, E., Alviggi, C., Lispi, M., Conforti, A., Hanyaloglu, A. C., Chuderland, D., Simoni, M., Raine-Fenning, N., Crépieux, P., Kol, S., Rochira, V., D'Hooghe, T., & Humaidan, P. (2021). Reduced FSH and LH action: Implications for medically assisted reproduction. *Human Reproduction*, 36(6), 1469-1480.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deab065>

Bracke, A., Peeters, K., Punjabi, U., Hoogewijs, D., & Dewilde, S. (2018). A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 36(3), 327-339.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.12.005>

Brigelius-Flohé, R., & Flohé, L. (2020). Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxidants & Redox Signaling*, 33(7), 498-516.
<https://doi.org/10.1089/ars.2019.7905>

Cannarella, R., Condorelli, R. A., Mongioi, L. M., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2020). Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently

- Idiopathic Male Infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1728. <https://doi.org/10.3390/ijms21051728>
- Caramaschi, D., Jungius, J., Page, C. M., Novakovic, B., Saffery, R., Halliday, J., Lewis, S., Magnus, M. C., London, S. J., Håberg, S. E., Relton, C. L., Lawlor, D. A., & Elliott, H. R. (2021). Association of medically assisted reproduction with offspring cord blood DNA methylation across cohorts. *Human Reproduction*, 36(8), 2403-2413. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab137>
- Casarini, L., & Crépieux, P. (2019). Molecular Mechanisms of Action of FSH. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 305. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00305>
- Castillo, J., Bogle, O. A., Jodar, M., Torabi, F., Delgado-Dueñas, D., Estanyol, J. M., Ballescà, J. L., Miller, D., & Oliva, R. (2019). Proteomic Changes in Human Sperm During Sequential in vitro Capacitation and Acrosome Reaction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 295. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00295>
- CDC, C. for D. C. and P. & US Dept of Health and Human Services. (2021). *The 2019 Assisted Reproductive Technology Fertility Clinic and National Summary Report*. <https://www.cdc.gov/art/reports/2019/pdf/2019-Report-ART-Fertility-Clinic-National-Summary-h.pdf>
- Cecchino, G. N., García-Velasco, J. A., & Rial, E. (2021). Reproductive senescence impairs the energy metabolism of human luteinized granulosa cells. *Reproductive BioMedicine Online*, 43(5), 779-787. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.08.006>

- Chen, H., Kui, C., & Chan, H. C. (2013). Ca²⁺ mobilization in cumulus cells: Role in oocyte maturation and acrosome reaction. *Cell Calcium*, 53(1), 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.11.007>
- Chermuła, B., Kranc, W., Jopek, K., Budna-Tukan, J., Hutchings, G., Dompe, C., Moncrieff, L., Janowicz, K., Józkwiaak, M., Jeseta, M., Petite, J., Mozdziak, P., Pawelczyk, L., Spaczyński, R. Z., & Kempisty, B. (2020). Human Cumulus Cells in Long-Term In Vitro Culture Reflect Differential Expression Profile of Genes Responsible for Planned Cell Death and Aging—A Study of New Molecular Markers. *Cells*, 9(5), 1265. <https://doi.org/10.3390/cells9051265>
- Da Luz, C. M., Da Broi, M. G., Koopman, L. de O., Plaça, J. R., da Silva-Jr, W. A., Ferriani, R. A., Meola, J., & Navarro, P. A. (2022). Transcriptomic analysis of cumulus cells shows altered pathways in patients with minimal and mild endometriosis. *Scientific Reports*, 12(1), 5775. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09386-4>
- Dai, C., Zhang, Z., Shan, G., Chu, L.-T., Huang, Z., Moskovtsev, S., Librach, C., Jarvi, K., & Sun, Y. (2021). Advances in sperm analysis: Techniques, discoveries and applications. *Nature Reviews Urology*, 18(8), 447-467. <https://doi.org/10.1038/s41585-021-00472-2>
- Danis, R. B., & Samplaski, M. K. (2019). Sperm Morphology: History, Challenges, and Impact on Natural and Assisted Fertility. *Current Urology Reports*, 20(8), 43. <https://doi.org/10.1007/s11934-019-0911-7>
- de Castro, L. S., de Assis, P. M., Siqueira, A. F. P., Hamilton, T. R. S., Mendes, C. M., Losano, J. D. A., Nichi, M., Visintin, J. A., & Assumpção, M. E. O. A. (2016). Sperm Oxidative Stress Is Detrimental to Embryo Development: A

- Dose-Dependent Study Model and a New and More Sensitive Oxidative Status Evaluation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2016/8213071>
- De Geyter, C. (2019). Assisted reproductive technology: Impact on society and need for surveillance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 33(1), 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.01.004>
- Dey, S., Brothag, C., & Vijayaraghavan, S. (2019). Signaling Enzymes Required for Sperm Maturation and Fertilization in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 341. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00341>
- Díaz Martel, A. G. (2021). *Efectos del sobrepeso, obesidad y dislipidemia en la reacción acrosomal del espermatozoide humano*. [Universidad Autónoma de Querétaro]. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/2812>
- Duffy, J. M. N., Adamson, G. D., Benson, E., Bhattacharya, S., Bhattacharya, S., Bofill, M., Brian, K., Collura, B., Curtis, C., Evers, J. L. H., Farquharson, R. G., Fincham, A., Franik, S., Giudice, L. C., Glanville, E., Hickey, M., Horne, A. W., Hull, M. L., Johnson, N. P., ... Youssef, M. A. (2021). Top 10 priorities for future infertility research: An international consensus development study. *Fertility and Sterility*, 115(1), 180-190. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.11.014>
- Eleutherio, E. C. A., Silva Magalhães, R. S., de Araújo Brasil, A., Monteiro Neto, J. R., & de Holanda Paranhos, L. (2021). SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 697, 108701. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>

- ESHRE Working group on Time-lapse technology, Apter, S., Ebner, T., Freour, T., Guns, Y., Kovacic, B., Le Clef, N., Marques, M., Meseguer, M., Montjean, D., Sfontouris, I., Sturmey, R., & Coticchio, G. (2020). Good practice recommendations for the use of time-lapse technology†. *Human Reproduction Open*, 2020(2), hoaa008. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa008>
- Evans, E. P. P., Scholten, J. T. M., Mzyk, A., Reyes-San-Martin, C., Llumbet, A. E., Hamoh, T., Arts, E. G. J. M., Schirhagl, R., & Cantineau, A. E. P. (2021). Male subfertility and oxidative stress. *Redox Biology*, 46, 102071. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102071>
- Farquhar, C. M., Bhattacharya, S., Repping, S., Mastenbroek, S., Kamath, M. S., Marjoribanks, J., & Boivin, J. (2019). Female subfertility. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0058-8>
- Fernandez, E. I., Ferreira, A. S., Cecílio, M. H. M., Chéles, D. S., de Souza, R. C. M., Nogueira, M. F. G., & Rocha, J. C. (2020). Artificial intelligence in the IVF laboratory: Overview through the application of different types of algorithms for the classification of reproductive data. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(10), 2359-2376. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01881-9>
- Ford, E. A., Beckett, E. L., Roman, S. D., McLaughlin, E. A., & Sutherland, J. M. (2020). Advances in human primordial follicle activation and premature ovarian insufficiency. *Reproduction*, 159(1), R15-R29. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0201>

- Gahlay, G. K., & Rajput, N. (2020). The enigmatic sperm proteins in mammalian fertilization: An overview†. *Biology of Reproduction*, 103(6), 1171-1185. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa140>
- Galasso, M., Gambino, S., Romanelli, M. G., Donadelli, M., & Scupoli, M. T. (2021). Browsing the oldest antioxidant enzyme: Catalase and its multiple regulation in cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 172, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.010>
- Gómez-Torres, M. J., García, E. M., Guerrero, J., Medina, S., Izquierdo-Rico, M. J., Gil-Izquierdo, Á., Orduna, J., Savirón, M., González-Brusi, L., Ten, J., Bernabeu, R., & Avilés, M. (2015). Metabolites involved in cellular communication among human cumulus-oocyte-complex and sperm during in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0118-9>
- Gong, Y., Luo, S., Fan, P., Zhu, H., Li, Y., & Huang, W. (2020). Growth hormone activates PI3K/Akt signaling and inhibits ROS accumulation and apoptosis in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00677-x>
- Gualtieri, R., Kalthur, G., Barbato, V., Longobardi, S., Di Rella, F., Adiga, S. K., & Talevi, R. (2021). Sperm Oxidative Stress during In Vitro Manipulation and Its Effects on Sperm Function and Embryo Development. *Antioxidants*, 10(7), 1025. <https://doi.org/10.3390/antiox10071025>
- Gupta, S. K. (2021). Human Zona Pellucida Glycoproteins: Binding Characteristics With Human Spermatozoa and Induction of Acrosome Reaction. *Frontiers in*

Cell and Developmental Biology, 9, 619868.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.619868>

He, M., Zhang, T., Yang, Y., & Wang, C. (2021). Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 654028. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.654028>

Hong, S.-J., Chiu, P. C.-N., Lee, K.-F., Tse, J. Y.-M., Ho, P.-C., & Yeung, W. S.-B. (2009). Cumulus cells and their extracellular matrix affect the quality of the spermatozoa penetrating the cumulus mass. *Fertility and Sterility*, 92(3), 971-978. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1760>

Ibtisham, F., & Honaramooz, A. (2020). Spermatogonial Stem Cells for In Vitro Spermatogenesis and In Vivo Restoration of Fertility. *Cells*, 9(3), 745. <https://doi.org/10.3390/cells9030745>

Jiang, F., Zhu, Y., Chen, Y., Tang, X., Liu, L., Chen, G., Liu, Y., & Sun, X. (2021). Progesterone activates the cyclic AMP-protein kinase A signalling pathway by upregulating *ABHD2* in fertile men. *Journal of International Medical Research*, 49(3), 030006052199952. <https://doi.org/10.1177/0300060521999527>

Jiménez-Movilla, M., Hamze, J. G., & Romar, R. (2021). Oolemma Receptors in Mammalian Molecular Fertilization: Function and New Methods of Study. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 662032. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.662032>

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K., & Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro

- fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 4892-4896. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018202108>
- Kanaka, V., Proikakis, S., Drakakis, P., Loutradis, D., & Tsangaris, G. Th. (2022). Implementing a preimplantation proteomic approach to advance assisted reproduction technologies in the framework of predictive, preventive, and personalized medicine. *EPMA Journal*, 13(2), 237-260. <https://doi.org/10.1007/s13167-022-00282-5>
- Karmilin, K., Schmitz, C., Kuske, M., Körschgen, H., Olf, M., Meyer, K., Hildebrand, A., Felten, M., Fridrich, S., Yiallourous, I., Becker-Pauly, C., Weiskirchen, R., Jahnen-Dechent, W., Floehr, J., & Stöcker, W. (2019). Mammalian plasma fetuin-B is a selective inhibitor of ovastacin and meprin metalloproteinases. *Scientific Reports*, 9(1), 546. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37024-5>
- Kato, Y., Ohshima, Y., Sasaki, A., Yoshikawa, E., Xu, H., & Nagao, Y. (2022). The secretion and metabolism of cumulus cells support fertilization in the bovine model. *Theriogenology*, 193, 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.025>
- Khawar, M. B., Gao, H., & Li, W. (2019). Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 195. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00195>
- Li, K., Sun, P., Wang, Y., Gao, T., Zheng, D., Liu, A., & Ni, Y. (2021). Hsp90 interacts with Cdc37, is phosphorylated by PKA/PKC, and regulates Src phosphorylation in human sperm capacitation. *Andrology*, 9(1), 185-195. <https://doi.org/10.1111/andr.12862>

- Liang, J., Gao, Y., Feng, Z., Zhang, B., Na, Z., & Li, D. (2023). Reactive oxygen species and ovarian diseases: Antioxidant strategies. *Redox Biology*, 62, 102659. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102659>
- Lin, J., & Wang, L. (2021). Oxidative Stress in Oocytes and Embryo Development: Implications for In Vitro Systems. *Antioxidants & Redox Signaling*, 34(17), 1394-1406. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8209>
- Lin, X., Dai, Y., Tong, X., Xu, W., Huang, Q., Jin, X., Li, C., Zhou, F., Zhou, H., Lin, X., Huang, D., & Zhang, S. (2020a). Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility. *Redox Biology*, 30, 101431. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101431>
- Lin, X., Dai, Y., Tong, X., Xu, W., Huang, Q., Jin, X., Li, C., Zhou, F., Zhou, H., Lin, X., Huang, D., & Zhang, S. (2020b). Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility. *Redox Biology*, 30, 101431. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101431>
- Lu, J., Wang, Z., Cao, J., Chen, Y., & Dong, Y. (2018). A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0391-5>
- Luo, M., Yang, Z., Huang, J., Wang, Y., Guo, B., & Yue, Z. (2020). Genistein protects ovarian granulosa cells from oxidative stress via cAMP-PKA signaling. *Cell Biology International*, 44(2), 433-445. <https://doi.org/10.1002/cbin.11244>
- Masjedi, F., Keshtgar, S., Zal, F., Talaei-Khozani, T., Sameti, S., Fallahi, S., & Kazeroni, M. (2020). Effects of vitamin D on steroidogenesis, reactive oxygen

- species production, and enzymatic antioxidant defense in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 197, 105521. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105521>
- Matos, L., Stevenson, D., Gomes, F., Silva-Carvalho, J. L., & Almeida, H. (2009). Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Molecular Human Reproduction*, 15(7), 411-419. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap034>
- Mauchart, P., Vass, R. A., Nagy, B., Sulyok, E., Bódis, J., & Kovács, K. (2023). Oxidative Stress in Assisted Reproductive Techniques, with a Focus on an Underestimated Risk Factor. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(2), 1272-1286. <https://doi.org/10.3390/cimb45020083>
- Mirzayans, R., & Murray, D. (2020). Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9090. <https://doi.org/10.3390/ijms21239090>
- Moreno-Irusta, A., Dominguez, E. M., Marín-Briggiler, C. I., Matamoros-Volante, A., Lucchesi, O., Tomes, C. N., Treviño, C. L., Buffone, M. G., Lascano, R., Losinno, L., & Giojalas, L. C. (2020). Reactive oxygen species are involved in the signaling of equine sperm chemotaxis. *Reproduction*, 159(4), 423-436. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0480>
- Morielli, T., & O'Flaherty, C. (2015). Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. *REPRODUCTION*, 149(1), 113-123. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0240>

NOM-087-ECOL-SSA1-2002. (s. f.). Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental—Salud ambiental—Residuos peligrosos biológico-infecciosos—Clasificación y especificaciones de manejo. *NOM-087-ECOL-SSA1-2002*.

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>

Nowicka-Bauer, K., & Nixon, B. (2020). Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility. *Antioxidants*, 9(2), 134. <https://doi.org/10.3390/antiox9020134>

Oehninger, S., & Kruger, T. F. (2021). Sperm morphology and its disorders in the context of infertility. *F&S Reviews*, 2(1), 75-92. <https://doi.org/10.1016/j.xfnr.2020.09.002>

Olowe, R., Sandouka, S., Saadi, A., & Shekh-Ahmad, T. (2020). Approaches for Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress Quantification in Epilepsy. *Antioxidants*, 9(10), 990. <https://doi.org/10.3390/antiox9100990>

Orisaka, M., Miyazaki, Y., Shirafuji, A., Tamamura, C., Tsuyoshi, H., Tsang, B. K., & Yoshida, Y. (2021). The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review. *Reproductive Medicine and Biology*, 20(2), 169-175. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12371>

Otasevic, V., Stancic, A., Korac, A., Jankovic, A., & Korac, B. (2020). Reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species in human male fertility. A crossroad of cellular signaling and pathology. *BioFactors*, 46(2), 206-219. <https://doi.org/10.1002/biof.1535>

Park, J. E., Lee, J., Lee, S. T., & Lee, E. (2021). In vitro maturation on ovarian granulosa cells encapsulated in agarose matrix improves developmental

- competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, 164, 42-50.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.01.008>
- Park, Y.-J., & Pang, M.-G. (2021). Mitochondrial Functionality in Male Fertility: From Spermatogenesis to Fertilization. *Antioxidants*, 10(1), 98.
<https://doi.org/10.3390/antiox10010098>
- Peters, A. E., Mihalas, B. P., Bromfield, E. G., Roman, S. D., Nixon, B., & Sutherland, J. M. (2020). Autophagy in Female Fertility: A Role in Oxidative Stress and Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(8), 550-568.
<https://doi.org/10.1089/ars.2019.7986>
- Prajapati, P., Kane, S., McBrinn, R. C., Dean, M. S., Martins Da Silva, S. J., & Brown, S. G. (2022). Elevated and Sustained Intracellular Calcium Signalling Is Necessary for Efficacious Induction of the Human Sperm Acrosome Reaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11253.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911253>
- Ribas-Maynou, J., & Yeste, M. (2020). Oxidative Stress in Male Infertility: Causes, Effects in Assisted Reproductive Techniques, and Protective Support of Antioxidants. *Biology*, 9(4), 77. <https://doi.org/10.3390/biology9040077>
- Richani, D., Dunning, K. R., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2021). Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: Essential role in determining oocyte developmental competence. *Human Reproduction Update*, 27(1), 27-47. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa043>
- Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L., & Dekel, N. (2016). Ovarian Folliculogenesis. En R. P. Piprek (Ed.), *Molecular Mechanisms of*

- Cell Differentiation in Gonad Development* (Vol. 58, pp. 167-190). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_7
- Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N., & Breitbart, H. (2004). Role of Hydrogen Peroxide in Sperm Capacitation and Acrosome Reaction1. *Biology of Reproduction*, 70(2), 518-522. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020487>
- Rodrigues, P., Limback, D., McGinnis, L., Marques, M., Aibar, J., & Plancha, C. E. (2021). Germ–Somatic Cell Interactions Are Involved in Establishing the Follicle Reserve in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 674137. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.674137>
- Russo, G., Notarstefano, V., Montik, N., Gioacchini, G., Giorgini, E., Polidori, A. R., Candela, F. A., Ciavattini, A., Cignitti, M., & Carnevali, O. (2022). Evaluation of Controlled Ovarian Stimulation Protocols in Patients with Normal and Low Ovarian Reserve: Analyses of miRNAs and Selected Target Genes Involved in the Proliferation of Human Cumulus Cells and Oocyte Quality. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1713. <https://doi.org/10.3390/ijms23031713>
- Sarmon, K. G., Eliassen, T., Knudsen, U. B., & Bay, B. (2021). Assisted reproductive technologies and the risk of stillbirth in singleton pregnancies: A systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 116(3), 784-792. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.04.007>
- Shen, M., Cao, Y., Jiang, Y., Wei, Y., & Liu, H. (2018). Melatonin protects mouse granulosa cells against oxidative damage by inhibiting FOXO1-mediated

- autophagy: Implication of an antioxidation-independent mechanism. *Redox Biology*, 18, 138-157. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.07.004>
- Siu, K. K., Serrão, V. H. B., Ziyat, A., & Lee, J. E. (2021). The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. *Journal of Cell Biology*, 220(10), e202102146. <https://doi.org/10.1083/jcb.202102146>
- Sun, P., Wang, Y., Gao, T., Li, K., Zheng, D., Liu, A., & Ni, Y. (2021). Hsp90 modulates human sperm capacitation via the Erk1/2 and p38 MAPK signaling pathways. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00723-2>
- Swain, N., Samanta, L., Goswami, C., Kar, S., Majhi, R. K., Kumar, S., & Dixit, A. (2022). TRPV1 channel in spermatozoa is a molecular target for ROS-mediated sperm dysfunction and differentially expressed in both natural and ART pregnancy failure. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 867057. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.867057>
- Tamburrino, L., Marchiani, S., Muratori, M., Luconi, M., & Baldi, E. (2020). Progesterone, spermatozoa and reproduction: An updated review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 516, 110952. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110952>
- Thunnissen, L. J. W., Cleypool, C. G. J., & de Bakker, B. S. (2021). Where do human sperm and egg meet? *Reproduction*, 161(1), V1-V4. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0375>
- Tu, J., Cheung, A. H.-H., Chan, C. L.-K., & Chan, W.-Y. (2019). The Role of microRNAs in Ovarian Granulosa Cells in Health and Disease. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 174. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00174>

- Turathum, B., Gao, E.-M., & Chian, R.-C. (2021). The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells*, 10(9), 2292. <https://doi.org/10.3390/cells10092292>
- Von Mengden, L., De Bastiani, M. A., Arruda, L. S., Link, C. A., & Klamt, F. (2022). Cumulus cell antioxidant system is modulated by patients' clinical characteristics and correlates with embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(6), 1277-1295. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02496-y>
- von Mengden, L., Klamt, F., & Smitz, J. (2020). Redox Biology of Human Cumulus Cells: Basic Concepts, Impact on Oocyte Quality, and Potential Clinical Use. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(8), 522-535. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7984>
- Wang, L., Tang, J., Wang, L., Tan, F., Song, H., Zhou, J., & Li, F. (2021). Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *Journal of Cellular Physiology*, 236(12), 7966-7983. <https://doi.org/10.1002/jcp.30468>
- Wang, X., Fan, G., Wei, F., Bu, Y., & Huang, W. (2019). Hyperoside protects rat ovarian granulosa cells against hydrogen peroxide-induced injury by sonic hedgehog signaling pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 310, 108759. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108759>
- Wang, Y., Yen, F. S., Zhu, X. G., Timson, R. C., Weber, R., Xing, C., Liu, Y., Allwein, B., Luo, H., Yeh, H.-W., Heissel, S., Unlu, G., Gamazon, E. R., Kharas, M. G., Hite, R., & Birsoy, K. (2021). SLC25A39 is necessary for mitochondrial glutathione import in mammalian cells. *Nature*, 599(7883), 136-140. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04025-w>

- Winterhager, E., & Kidder, G. M. (2015). Gap junction connexins in female reproductive organs: Implications for women's reproductive health. *Human Reproduction Update*, 21(3), 340-352. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv007>
- World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 271.
- World Health Organization. (2020, septiembre). *Infertility*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
- Wyse, B. A., Fuchs Weizman, N., Kadish, S., Balakier, H., Sangaralingam, M., & Librach, C. L. (2020). Transcriptomics of cumulus cells – a window into oocyte maturation in humans. *Journal of Ovarian Research*, 13(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00696-7>
- Xu, R., Li, C., Liu, X., & Gao, S. (2021). Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos. *Protein & Cell*, 12(1), 7-28. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00757-z>
- Xu, Y., Fan, S., Liu, Y., Shi, J., Xie, X., Wang, X., Wang, C., Liu, X., & Xia, G. (2022). HDAC1 in the Ovarian Granulosa Cells of Tan Sheep Improves Cumulus Cell Expansion and Oocyte Maturation Independently of the EGF-like Growth Factors. *Biology*, 11(10), 1464. <https://doi.org/10.3390/biology11101464>
- Yang, Q., Zhu, L., & Jin, L. (2020). Human Follicle in vitro Culture Including Activation, Growth, and Maturation: A Review of Research Progress. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 548. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00548>

- Yu, D., Zha, Y., Zhong, Z., Ruan, Y., Li, Z., Sun, L., & Hou, S. (2021). Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 339, 129878. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129878>
- Zaidi, S. K., Shen, W.-J., Cortez, Y., Bittner, S., Bittner, A., Arshad, S., Huang, T.-T., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2021). SOD2 deficiency-induced oxidative stress attenuates steroidogenesis in mouse ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 519, 110888. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110888>
- Zhai, B., Li, X., Zhao, Z., Cao, Y., Liu, X., Liu, Z., Ma, H., & Lu, W. (2023). Melatonin Protects the Apoptosis of Sheep Granulosa Cells by Suppressing Oxidative Stress via MAP3K8 and FOS Pathway. *Genes*, 14(5), 1067. <https://doi.org/10.3390/genes14051067>
- Zhang, H., Li, C., Wen, D., Li, R., Lu, S., Xu, R., Tang, Y., Sun, Y., Zhao, X., Pan, M., & Ma, B. (2022). Melatonin improves the quality of maternally aged oocytes by maintaining intercellular communication and antioxidant metabolite supply. *Redox Biology*, 49, 102215. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102215>

12. ANEXOS

Anexo 1. Folleto de invitación para pacientes masculinos.

¿SABES QUÉ ES LA FERTILIDAD MASCULINA?



Invitación a participar en el proyecto de Medicina Reproductiva de la Maestría en Ciencias Químico Biológicas.



Procedimiento:

En el laboratorio se evalúa el pH, el volumen, la concentración y movilidad de los espermias, además de la reacción acrosomal con PSA-FITC como indicador del potencial de fertilidad masculino.

✉ ros.cumulus@gmail.com

☎ 442 1416344

Eres elegible si:

- Eres hombre y tienes entre 18 a 45 años.
- No padeces una enfermedad de transmisión sexual (VIH, clamidia, sífilis, gonorrea, VPH, herpes...)
- Tienes al menos 2 días sin tener relaciones sexuales
- No has consumido medicamentos o drogas recreativas en los últimos 7 días
- No tienes vasectomía

Anexo 2. Consentimiento informado para participantes masculinos.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA.

Como participante invitado a esta investigación usted goza de los siguientes derechos:

1. Saber qué área, tema o asunto se está estudiando.
2. Saber qué sucederá y cuáles son los procedimientos.
3. Saber los riesgos potenciales o incomodidades del estudio, si es que las hay.
4. Saber si se debe esperar algún beneficio al participar y si lo hay en que consiste.
5. Puede preguntar acerca del estudio antes de consentir y durante el estudio.
6. Saber qué tratamiento está disponible si ocurre una complicación o lesión como resultado de la investigación.
7. Poder negarse a participar en el estudio o dejar de participar una vez iniciado.
8. Recibir copias de los derechos de los sujetos participantes de experimentos y forma de consentimiento firmado y fechada.
9. Estar libre de presiones para participar en el estudio.

Si usted tiene alguna duda o pregunta relacionada con este estudio o piensa que quizás esté sufriendo algún daño al estar participando en el estudio por favor contacte a los investigadores responsables en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto, Carr. a Chichimequillas S/N, Ejido Bolaños, 76140 Santiago de Querétaro, Qro. Tel. 192 12 00 ext.en horario de 9:00 am a 2:00 pm, con la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie.

TÍTULO DEL ESTUDIO.

Efecto inhibitor de la reacción acrosomal del espermatozoide humano por la presencia de especies reactivas de oxígeno en células del cúmulus.

OBJETIVO.

Determinar el efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre la interacción de las células del cúmulus con la reacción acrosomal en el espermatozoide humano.

PROCEDIMIENTOS.

1. Se canalizará a usted participante a la clínica de fertilidad INSEFER ubicado en Lic. Manuel Gómez Morín 3870, Torre Lomas, 1er piso. Centro Sur, 76090 Santiago de Querétaro, Qro.

2. Al asegurar el cumplimiento de los criterios de inclusión se hará entrega del consentimiento informado a usted interesado en participar, en el cual se explican los estudios a realizar y los beneficios que obtendrá del estudio. Así mismo se hace de su conocimiento que el material biológico que nos proporcionará solo será empleado en este estudio y no en algún otro, tampoco será congelado y no se utilizará con fines reproductivos. Al término del estudio su muestra será desechada de una forma adecuada.

Si decide participar se le asignará una fecha para acudir a las instalaciones indicadas en el punto 1, es de suma importancia que cuente con al menos 48 horas de abstinencia sexual.

3. El día acordado para la recolección de muestra, se le entregará un frasco estéril y se le hará pasar al masturbatorio de la clínica, que es un cuarto en condiciones adecuadas para que pueda proporcionar la muestra, o en su defecto se le pide que lleve su muestra en un frasco estéril en menos de 1 hora desde la obtención de la muestra a la clínica de fertilidad.

4. A la muestra de semen obtenida se le realizará la medición de los siguientes parámetros pH, color, volumen, viscosidad, motilidad y morfología.

6. Se inducirá reacción acrosomal en los espermatozoides y posteriormente se teñirán con PSA-FITC para evaluarse con microscopía de fluorescencia.

7. Se le proporcionará una fecha estimada para la entrega de resultados.

RIESGOS.

El participar en el estudio no genera ningún tipo de riesgo hacia su persona.

RESULTADOS.

Se le brindará un informe de resultados correspondientes a los parámetros evaluados en el espermiograma o seminograma, en caso de que a través del espermiograma se identifique que usted presenta irregularidades en alguno de los parámetros evaluados, será notificado.

BENEFICIOS:

Se realizará un espermiograma a la muestra de semen de manera gratuita, a través de los resultados obtenidos usted podrá conocer su calidad espermática.

CONFIDENCIALIDAD.

Sólo los investigadores tendrán acceso a toda la información y resultados generados en este estudio. Los datos obtenidos serán publicados en revistas científicas, pero se presentarán como valores grupales para proteger su identidad como participante. Usted será identificado por un número y su nombre no será usado. Los datos se mantendrán en total confidencialidad.

COSTOS.

Todos los gastos de los análisis y evaluaciones previamente mencionadas serán pagados por parte del proyecto de investigación y usted a cambio recibirá información importante en relación con su salud.

DERECHO A NEGARSE O RETIRARSE.

Usted puede decidir NO participar sin consecuencias negativas. Además, puede cambiar de parecer y retirarse del proyecto aun cuando ya haya empezado. Si nosotros encontramos información importante durante el transcurso de nuestro estudio, ésta se le dará a conocer y quizás esto le haga pensar en su participación en este estudio.

CONSENTIMIENTO.

Su firma, indicará que usted ha decidido participar voluntariamente en nuestro estudio, que ha leído esta información y que se le ha mencionado en que consiste el estudio. Usted recibirá una copia de este consentimiento firmada para que la tenga consigo. También se le dará una copia de los derechos que tiene al participar en este estudio y las obligaciones para presentarse adecuadamente el día de los estudios.

Nombre y firma del participante

Fecha

Ana Laura Gutiérrez Silva
Nombre y firma del investigador

Fecha

Nombre y teléfono del investigador principal:

- Q.F.B Ana Laura Gutiérrez Silva
- Celular: 442 141 6344
- Correo: ros.cumulus@gmail.com

REVOCACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mediante el presente formato, dejo constancia de mi decisión de la revocación del consentimiento informado firmado el día: en el que consentí la utilización de mi muestra biológica para la realización del proyecto de investigación “Efecto de la presencia de ROS en células del cúmulus sobre la Reacción Acrosomal del espermatozoide humano”.

Nombre y firma del participante:

Fecha de revocación:

Anexo 3. Consentimiento informado para participantes femeninos.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA.

Como participante invitada a esta investigación usted goza de los siguientes derechos

1. Saber qué área, tema o asunto se está estudiando.
2. Saber qué sucederá y cuáles son los procedimientos.
3. Saber los riesgos potenciales o incomodidades del estudio, si es que las hay.
4. Saber si se debe esperar algún beneficio al participar y si lo hay en que consiste.
5. Puede preguntar acerca del estudio antes de consentir y durante el estudio.
6. Saber qué tratamiento está disponible si ocurre una complicación o lesión como resultado de la investigación.
7. Poder negarse a participar en el estudio o dejar de participar una vez iniciado.
8. Recibir copias de los derechos de los sujetos participantes de experimentos y forma de consentimiento firmado y fechada.
9. Estar libre de presiones para participar en el estudio.

Si usted tiene alguna duda o pregunta relacionada con este estudio o piensa que quizás esté sufriendo algún daño al estar participando en el estudio por favor contacte a los investigadores responsables en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto, Carr. a Chichimequillas S/N, Ejido Bolaños, 76140 Santiago de Querétaro, Qro. Tel. 192 12 00 en horario de 9:00 am a 2:00 pm, con la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie.

TÍTULO DEL ESTUDIO.

Efecto inhibitor de la reacción acrosomal del espermatozoide humano por la presencia de especies reactivas de oxígeno en células del cúmulus.

OBJETIVO.

Determinar el efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre la interacción de las células del cúmulus con la reacción acrosomal en el espermatozoide humano.

PROCEDIMIENTOS.

1. Se canalizará a usted participante que quiere realizarse algún procedimiento de reproducción asistida en la clínica de fertilidad INSEFER ubicado en Lic. Manuel Gómez Morín 3870, Torre Lomas, 1er piso. Centro Sur, 76090 Santiago de Querétaro, Qro.

2. Al asegurar el cumplimiento de los criterios de inclusión se le hará entrega del consentimiento informado a usted interesada en participar, en el cual se explicará el procesamiento que tendrá su muestra de células de la granulosa, que no participan en su tratamiento de infertilidad y no repercutirá de manera negativa en el resultado del mismo. También se hará de su conocimiento que el material biológico que nos proporcionará solo será empleado en este estudio y no se utilizará con fines reproductivos. Al término del estudio su muestra será desechada de una forma adecuada.

3. La obtención de la muestra se realizará mediante la punción de folículos que consiste en la aspiración del líquido contenido en cada folículo, procedimiento que realizará un médico especialista, esta intervención se llevará a cabo en un quirófano y se controlará mediante ecografía transvaginal además se realizará bajo anestesia general asegurando que durante el procedimiento usted no sienta incomodidad o dolor. En el laboratorio, un embriólogo experimentado recolectará los ovocitos obtenidos y retirará las células de la granulosa con ayuda de unas agujas, dejando únicamente los óvulos para su tratamiento de fertilidad.

4. Las células recolectadas serán tratadas para disgregarlas para realizar una suspensión celular, misma a la que se le inducirá estrés oxidativo.

5. Adicionalmente se evaluarán las especies reactivas de oxígeno en las células mediante una sonda fluorescente. También se emplearán kits comerciales para la cuantificación de la actividad de enzimas antioxidantes para su medición mediante ensayos colorimétricos.

5. Finalmente, las células de la granulosa se incubarán con espermatozoides de participantes masculinos incluidos en este estudio y posteriormente será evaluada a través de una tinción con PSA-FITC la reacción acrosomal para visualizarse con microscopia de fluorescencia.

RIESGOS.

El participar en el estudio no genera un riesgo adicional hacia su persona más los que se describen en el consentimiento proporcionado por la clínica INSEFER que se enlistan a continuación; infección genital, torsión ovárica, hemorragia, punción de una parte anatómica diferente al ovario y los propios de la anestesia.

RESULTADOS.

Los resultados de esta investigación no afectan de ninguna manera los resultados esperados en su procedimiento de reproducción asistida.

BENEFICIOS:

La participante no recibirá alguna compensación económica por su participación en este estudio. Como parte de los resultados del protocolo de investigación se le hará llegar un informe con el nivel total de progesterona en su muestra de células de la granulosa, información que puede ser de utilidad para su médico tratante.

CONFIDENCIALIDAD.

Sólo los investigadores tendrán acceso a toda la información y resultados generados en este estudio. Los datos obtenidos serán publicados en revistas científicas, pero se presentarán como valores grupales para proteger su identidad como participante. Usted será identificada por un número y su nombre no será usado. Los datos se mantendrán en total confidencialidad.

COSTOS.

Todos los gastos derivados de este estudio serán pagados por parte del proyecto de investigación. Este estudio no se hará responsable de los gastos correspondientes a los medicamentos y tratamiento de reproducción asistida que se realizará en la clínica de fertilidad INSEFER.

DERECHO A NEGARSE O RETIRARSE.

Usted puede decidir NO participar sin consecuencias negativas. Además, puede cambiar de parecer y retirarse del proyecto aun cuando ya haya empezado.

CONSENTIMIENTO.

Su firma, indicará que usted ha decidido participar voluntariamente en nuestro estudio, que ha leído esta información y que se le ha mencionado en que consiste el estudio. Usted recibirá una copia de este consentimiento firmada para que la tenga consigo. También se le dará una copia de los derechos que tiene al participar es este estudio.

Nombre y firma del participante

Fecha

Ana Laura Gutiérrez Silva
Nombre y firma del investigador

Fecha

Nombre y teléfono del investigador principal:

- Q.F.B Ana Laura Gutiérrez Silva
- Celular: 442 141 6344
- Correo: ros.cumulus@gmail.com

REVOCACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mediante el presente formato, dejo constancia de mi decisión de la revocación del consentimiento informado firmado el día: en el que consentí la utilización de mi muestra biológica para la realización del proyecto de investigación “Efecto de la presencia de ROS en células del cúmulus sobre la Reacción Acrosomal del espermatozoide humano”.

Nombre y firma de la participante:

Fecha de revocación: