

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**  
Departamento de Especialidades  
Quirúrgicas, Bioquímica e Inmunología



**Tesis Doctoral**

**EXPRESIÓN GÉNICA DE CLUSTERINA EN EL  
ESPERMATOZOIDE Y SU RELACIÓN  
CON LA FERTILIDAD**

**María Hernández Herrador**

Málaga, 2017



**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**  
**DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES**  
**QUIRÚRGICAS, BIOQUÍMICA E INMUNOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**


**EXPRESIÓN GÉNICA DE CLUSTERINA EN EL  
ESPERMATOZOIDE Y SU RELACIÓN CON LA  
FERTILIDAD.**

**María Hernández Herrador**  
**Málaga 2017**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: María Hernández Herrador

 <http://orcid.org/0000-0003-1468-694X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**  
**DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES**  
**QUIRÚRGICAS, BIOQUÍMICA E INMUNOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**EXPRESIÓN GÉNICA DE CLUSTERINA EN EL**  
**ESPERMATOZOIDE Y SU RELACIÓN CON LA**  
**FERTILIDAD**

**María Hernández Herrador**

**Directores :**

**Dr. D. Maximino Redondo Bautista**

**Dra. Dña. María Luisa Hortas Nieto**

**Málaga 2017**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**D. MAXIMINO REDONDO BAUTISTA, DOCTOR EN MEDICINA, ESPECIALISTA EN ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL "COSTA DEL SOL" DE MARBELLA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS, BIOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE MÁLAGA.**

**CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado "EXPRESIÓN GÉNICA DE CLUSTERINA EN EL ESPERMATOZOIDE Y SU RELACIÓN CON LA FERTILIDAD", ha sido realizado bajo mi dirección por Dña. María Hernández Herrador, para optar al título de Doctora por la Universidad de Málaga.**

**Y para que conste, firmo el presente certificado en Málaga a 4 de Enero de 2017.**



**Fdo. Dr. D. Maximino Redondo Bautista**



**DÑA. MARIA LUISA HORTAS NIETO, DOCTORA EN FARMACIA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, ESPECIALISTA EN ANÁLISIS CLÍNICOS Y DIRECTORA DEL AREA INTEGRADA DE GESTIÓN DE LABORATORIOS CLINICOS DEL HOSPITAL "COSTA DEL SOL" DE MARBELLA.**

**CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado "EXPRESIÓN GÉNICA DE CLUSTERINA EN EL ESPERMATOZOIDE Y SU RELACIÓN CON LA FERTILIDAD", ha sido realizado bajo mi dirección por Dña. María Hernández Herrador, para optar al título de Doctora por la Universidad de Málaga.**

**Y para que conste, firmo el presente certificado en Málaga a 4 de Enero de 2017.**



**Fdo. Dra. Dña. María Luisa Hortas Nieto.**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **AGRADECIMIENTOS.**

*Al Dr. Maximino Redondo, director de la presente tesis, porque sus investigaciones previas en el Hospital Costa del Sol me han servido de punto de partida y guía para el presente proyecto. Gracias por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por su disponibilidad y por su asesoramiento.*

*A la Dra. Marisa Hortas, codirectora de esta tesis doctoral, por permitirme realizarla, transmitirme su disciplina y animarme siempre a que continuara. Por todo lo que he aprendido desde que llegué al hospital bajo su dirección que me ha hecho mejor profesional. Por sus consejos en lo laboral y lo personal.*

*A Zaira Caracuel, doctora en Biología y Coordinadora del Biobanco del Hospital Costa del Sol hasta Julio de 2016, por su ayuda, sus enseñanzas en la investigación experimental y por sus correcciones, sin duda ha sido un pilar para realizar esta tesis.*

*A Dr. José Antonio Castilla y al resto de componentes de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, por colaborar tan activamente en mi tesis doctoral, tanto en la recogida de muestras como en el asesoramiento del diseño.*

*A la Dra. Inmaculada Bellido Estévez, directora de los cursos de doctorado de Farmacología y Terapéutica, por haber estado siempre disponible para ayudarme.*

*A mis antiguas compañeras del Laboratorio de Reproducción Asistida del Hospital Costa del Sol, Paqui y Noelia, con las que empecé este proyecto, por su ayuda en la recogida de muestras y datos.*

*Al personal de los laboratorios de Anatomía Patológica y de Biología Molecular del Hospital Costa de Sol, que me ha ayudado en la fase experimental de este trabajo, por su disponibilidad y amabilidad a la hora de contestar a muchas de mis dudas.*

*A mis actuales compañeros de la Unidad de Reproducción Asistida Humana del Hospital Costa del Sol que por su buen trabajo diario he podido disponer de parte del tiempo para realizar esta tesis y que hacen que día a día tengamos una unidad de trabajo más consolidada y con un ambiente de trabajo excepcional.*



*A mis padres por las oportunidades que me dieron.  
A María del Mar, por ser siempre un ejemplo para mí.  
Y a Javier, por su compartir su vida conmigo.*



# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN.

|   |           |
|---|-----------|
| 1. La infertilidad.   | 19        |
| 2. Tratamientos de reproducción asistida.                                       | 21        |
| 2.1. Fecundación <i>in vitro</i> .  |           |
| 3. Estudio del factor masculino.  | 24        |
| 4. Genómica, proteómica y metabolómica en el estudio de infertilidad masculina. | 27        |
| 5. Clusterina.  | 32        |
| 5.1. Gen de la clusterina y productos de transcripción.                         |           |
| 5.2. Isoformas de la clusterina.  | 34        |
| 5.3. Expresión de la clusterina.  | 35        |
| 5.4. Función de la clusterina.  | 36        |
| 5.5. Papel de la clusterina en cáncer.  | 39        |
| 5.6. Presencia de clusterina en el tracto reproductor masculino.                | 40        |
| 5.7. La clusterina en el espermatozoide.  | 40        |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b>  | <b>43</b> |
| <b>OBJETIVOS</b>  | <b>47</b> |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>   |           |
| 1. Diseño del estudio.  | 53        |
| 2. Ámbito del estudio.  | 54        |
| 3. Sujetos de estudio.  | 56        |

|   |    |
|---|----|
| 4. Técnicas de laboratorio.   |    |
| 4.1. Seminograma. Estudio del factor masculino.   | 58 |
| 4.2. Preparación de muestras seminales para ciclos de<br>fecundación <i>in vitro</i> .  | 62 |
| 4.3. Inmunohistoquímica. Estudio de expresión proteica.                                 | 63 |
| 4.4. Técnicas previas al estudio de expresión génica.                                   | 65 |
| 4.4.1. Congelación de muestras espermáticas.  |    |
| 4.4.2. Descongelación de muestras espermáticas.   | 66 |
| 4.4.3. Extracción de ARN.   | 67 |
| 4.4.4. Síntesis de ADN copia.   | 68 |
| 4.4.5. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).                                       | 69 |
| 4.4.6. Electroforesis en gel de agarosa.  | 70 |
| 4.4.7. Gen clean.   | 71 |
| 4.5. Quantitative Real Time Polimerase qRT-PCR.   | 73 |
| 5. Variables.   | 75 |
| 5.1. Variables definidas para resultados generales<br>y definir grupos de estudio.      | 76 |
| 5.2. Variables definidas para estudio del factor masculino.<br>Seminograma.             | 76 |
| 5.3. Variables definidas para el estudio de expresión<br>de clusterina.                 | 77 |
| 5.4. Variables clínicas. Resultados del tratamiento de<br>fecundación <i>in vitro</i> . | 79 |
| 6. Fuente y recogida de datos.  | 81 |
| 7. Soporte informático.   | 82 |
| 8. Análisis estadístico.  | 83 |

## **RESULTADOS.**

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 1. Descripción de grupos de estudio. | 89 |
| 1.1. Grupo control.                  |    |
| 1.2. Grupo de pacientes.             | 90 |

|   |     |
|---|-----|
| 2. Optimización de la fase experimental del estudio.  | 97  |
| 2.1. Ensayo de expresión por inmunohistoquímica.  |     |
| 2.2. Ensayo de expresión por RT-PCR.  | 98  |
| 2.3. Elección de <i>house keeping</i> y elaboración de curvas patrón.   | 99  |
| 2.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).  | 102 |
| 3. Localización y expresión de clusterina en el espermatozoide. Objetivo 1.   | 103 |
| 4. Relación entre la expresión de clusterina y las variables del seminograma. Objetivo 2.                                 | 114 |
| 5. Diferencias en la expresión de clusterina entre los grupos de estudio. Objetivo 3.                                     | 117 |
| 6. Relación de la expresión de clusterina y los resultados de un tratamiento de fecundación <i>in vitro</i> . Objetivo 4. | 122 |

## **DISCUSIÓN**

|   |     |
|---|-----|
| 1. Localización y expresión de clusterina en el espermatozoide.   | 127 |
| 2. Relación entre la expresión de clusterina y las variables del seminograma.                                 | 130 |
| 3. Diferencias en la expresión de clusterina entre los grupos de estudio.                                     | 134 |
| 4. Relación de la expresión de clusterina y los resultados de un tratamiento de fecundación <i>in vitro</i> . | 137 |

|                     |     |
|---------------------|-----|
| <b>LIMITACIONES</b> | 141 |
|---------------------|-----|

|                     |     |
|---------------------|-----|
| <b>CONCLUSIONES</b> | 145 |
|---------------------|-----|

|                     |     |
|---------------------|-----|
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> | 149 |
|---------------------|-----|

## **ANEXOS**

|      |  |     |
|------|--|-----|
| I.   | Certificado de comité de ética.  | 175 |
| II.  | Petición de estudio andrológico (seminograma).   | 176 |
| III. | Formulario de historia clínica de reproducción<br>(software <i>Doctor</i> ).               | 177 |
| IV.  | Formulario de pruebas de laboratorio clínico: Seminograma<br>(software <i>S.I.G.L.O</i> ). | 178 |
| V.   | Formulario de datos de laboratorio de tratamiento de F.I.V.<br>(Software <i>Lotus</i> ).   | 179 |
| VI.  | Formulario de recogida de datos del estudio.   | 180 |
| VII. | Curvas patrón y gráfica melting.   |     |
|      | a. Curva patrón y gráfica melting para clusterina.   | 181 |
|      | b. Curva patrón y gráfica melting para 18S ribosómico.                                     | 182 |
|      | c. Curva patrón y gráfica melting para GADPH.  | 183 |

## INTRODUCCIÓN



## 1. La infertilidad.

Las parejas que consultan por esterilidad lo hacen, en su mayoría, porque la falta de descendencia les produce un gran malestar a nivel psicológico. La esterilidad es definida como la incapacidad de una pareja para concebir después de un año de relaciones sexuales frecuentes, sin medidas anticonceptivas. Su prevalencia se ha estimado en un 15% de las parejas con edad reproductiva. Por el peso de la influencia de la literatura anglosajona se tiende a englobar en esta definición también el concepto de infertilidad, aunque en su definición estricta este último término define la incapacidad de lograr un recién nacido vivo, al menos, tras haber logrado dos embarazos consecutivos. Esto se traduce en 60-80 millones de parejas infértiles en el mundo. En España estas parejas ascienden a más de 800.000 y el número de nuevos casos crece a un ritmo de 16.000 al año. Además, cerca del 15% de las parejas españolas en edad fértil tienen problemas a la hora de concebir un hijo de manera natural.

Las condiciones particulares de cada pareja, el factor que origina la esterilidad, así como la edad, pueden influir en el aumento o disminución de la probabilidad de embarazo. Se han clasificado las causas de esterilidad en factor masculino, factor femenino (ovárico, cervical, uterino y tubario), factor inmunológico y factor psicológico. Existe un cierto número de parejas en las que, tras haber completado todos los estudios, no se encuentra ninguna causa que la justifique, corresponden al 3-20% y se denomina esterilidad de origen idiopático o esterilidad de origen desconocido. Se estima que el factor masculino es el responsable del 30% de los casos de infertilidad, mientras que al factor femenino se le atribuye otro 30%, el resto puede deberse a factores mixtos, provenientes de ambos miembros de la pareja y al resto de causas anteriormente mencionadas (Fundamentos de Reproducción, SEGO<sup>1</sup> 2009).

En el estudio de la pareja estéril, el primer paso es intentar diferenciar la causa de esterilidad. Se debe comenzar con la elaboración de una historia clínica en la que se detallen los antecedentes de ambos miembros de la pareja. La anamnesis debe incluir datos de los antecedentes clínicos que puedan estar relacionados con esterilidad: intervenciones quirúrgicas, tratamientos y enfermedades previas, embarazos o hijos previos tanto con la pareja actual como con otra, etc.,

---

<sup>1</sup> Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia.

completando el estudio con una serie de pruebas diagnósticas. Para la mujer, normalmente se realizan diferentes pruebas hormonales para confirmar la existencia de ovulación, serologías y una histerosalpingografía para descartar obstrucción en las trompas. En el caso del hombre se realizan pruebas hormonales, serologías y un espermograma para ver la calidad seminal (OMS 1999<sup>2</sup>). A partir de los resultados obtenidos se puede indicar a la pareja la necesidad de realizar un tratamiento de reproducción asistida.

---

<sup>2</sup> WHO Laboratory Manual for examination of Human Semen. Cambridge University Press.

## **2. Tratamientos de reproducción asistida.**

Existen diferentes tipos de tratamientos en reproducción asistida, la elección del método dependerá de los antecedentes de la pareja, del resultado de las pruebas diagnósticas realizadas y de las probabilidades de éxito, entendiendo esto como la consecución de un embarazo (Fundamentos de Reproducción, SEGO 2009). Los usados más frecuentemente son: Coitos dirigidos, consiste en controlar el momento de la ovulación de la mujer para que la pareja realice un coito; la inseminación artificial, se realiza inyectando una muestra de espermatozoides móviles capacitados en la cavidad uterina de la mujer y el tratamiento de fecundación *in vitro* (F.I.V.).

### **2.1. Fecundación *in vitro*.**

En la década de los 80 se desarrollaron las técnicas de fecundación *in vitro*. Estas técnicas consisten en realizar una fecundación y permitir el desarrollo embrionario durante 3 ó 6 días fuera del aparato reproductor femenino. Es el tratamiento que se utiliza cuando no están indicadas las técnicas previamente citadas, por existir una causa de esterilidad importante como edad avanzada, obstrucción de trompas, baja concentración o mala morfología espermática etc., o cuando habiéndolas realizado, no hemos obtenido embarazo.

Para llevarlas a cabo, la mujer es sometida a un tratamiento de estimulación ovárica. En el momento de la ovulación, se realiza la punción folicular para extraer los óvulos que se inseminarán posteriormente en el laboratorio, con espermatozoides obtenidos a partir de una muestra procedente de su pareja o de un donante, mediante dos técnicas: La llamada F.I.V. o Convencional y la técnica de Microinyección Espermática o I.C.S.I. (*Intracytoplasmatic Sperm Injection*).

La primera consiste en realizar un co-cultivo de ovocitos y espermatozoides en una misma placa de cultivo, consiguiendo un acercamiento físico que favorece el proceso de fecundación, y la segunda es un procedimiento mediante el cual se inyecta con una microaguja un espermatozoide dentro del ovocito (Imagen 1).

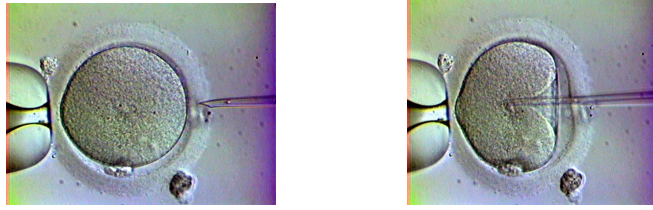


Imagen 1. Técnica de microinyección espermática (ICSI).

En ambas técnicas deben transcurrir entre 17 y 20 horas para detectar en el óvulo los signos que nos indican una correcta fecundación. Posteriormente aquellos que presenten esos signos adecuados formarán un embrión, apareciendo la primera división entre las 8 y 24 horas siguientes. Durante los siguientes días del desarrollo, los embriones de la paciente son evaluados y clasificados normalmente en base a características morfocinéticas. También se puede realizar, sólo en los casos indicados clínicamente, un diagnóstico genético preimplantacional para descartar ciertas alteraciones genéticas en los embriones. Con esto se podrán clasificar los embriones en aptos o no, para su posterior utilización.

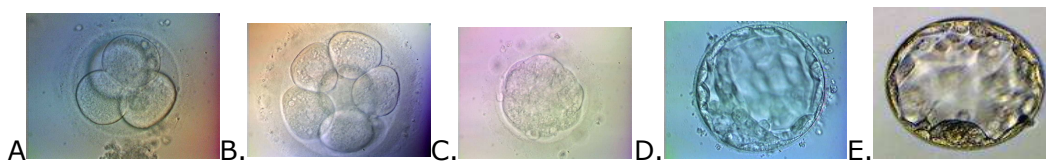


Imagen 2. Estadios embrionarios: A. Embrión en estadio de 4 células, corresponde al desarrollo a las 24 horas de fecundación. B. Embrión en estadio de 8 células, corresponde al desarrollo a las 48 horas de la fecundación. C. Embrión en estadio de mórula correspondiente al 4º día de desarrollo. D. Embrión en estadio de blastocisto, 5º día de desarrollo. E. Estadio de blastocisto expandido, 6º día de desarrollo.

Los embriones conseguidos se transfieren al interior del útero de la mujer, en número máximo de 3, según la legislación española (LEY 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida), aunque lo más habitual es transferir uno o dos, para evitar las gestaciones múltiples. La transferencia embrionaria suele realizarse el segundo o tercer día tras la fecundación, como máximo, puede posponerse hasta un período de cultivo *in vitro* que lleve al embrión a la formación del blastocisto, que se alcanza entre los 5 ó 6 días de desarrollo. Posteriormente, se realiza la congelación de los embriones y/o blastocistos restantes que evolucionan favorablemente. Estos podrán ser utilizados en posteriores transferencias por la propia paciente. Desde el momento de la transferencia hasta la realización del test de gestación transcurren entre 12 y 14

días. La prueba que se suele realizar es la determinación en sangre o en orina de los niveles de la hormona beta-gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ -hCG) que produce el embrión y que pasa a la madre a través de la placenta. Es la primera señal que envía el embrión y que podemos medir como prueba de su implantación.

### 3. Estudio del factor masculino

El estudio de la pareja estéril debe ser simultáneo, tanto para el hombre como para la mujer. Al ser la infertilidad con mucha frecuencia una patología multifactorial, es básico realizar una historia clínica minuciosa y protocolizada tanto en aspectos clínicos como reproductivos. Como ya hemos dicho anteriormente, se estima que el factor masculino es el responsable del 30% de los casos de infertilidad de forma aislada, llegando a ser hasta el 45-50% en combinación con otro factor (Iammarrone et al., 2003; Jarow, 2007; Carrell, 2012; Winters y Walsh, 2014).

Es cierto que el estudio del factor masculino está subestimado, principalmente por el enmascaramiento del factor femenino, ya que casi siempre el estudio de la pareja infértil comienza con el estudio de la mujer en la consulta ginecológica, siendo más exhaustivo, a lo que se añade que en la mayoría de los casos, el estudio del factor masculino se limite a un seminograma y un estudio serológico. De hecho, en un artículo publicado por la *National Survey of Family Growth* estadounidense (NSFG) se estima que entre el 18 y el 27 % de los varones de parejas infértiles no son evaluados (Winters y Walsh, 2014).

En la anamnesis del varón deberíamos identificar multitud de datos. Son esenciales los antecedentes personales del nacimiento, la existencia de prematuridad, infancia y pubertad. Las malformaciones genéticas (genitourinarias) o infecciones víricas como la parotiditis pueden estar relacionadas con un descenso de fertilidad. Debido a que hay muchos factores que pueden intervenir en la infertilidad masculina deben constar los antecedentes de cirugía testicular por criptorquidia, cirugía inguinal por hernias, así como otros procedimientos quirúrgicos pélvicos, procesos inflamatorios (epididimitis y orquitis), traumatismos testiculares, atrofas y estados obstructivos de las vías seminales, radio o quimioterapia. Hay que entrevistar al paciente sobre su estilo de vida, la obesidad, la posibilidad de exposición a radiaciones o tóxicos (herbicidas, pesticidas, drogas y alcohol), como factores de mal pronóstico. La exploración andrológica y la ecografía testicular son siempre necesarias ante la sospecha de cualquier tipo de patología (ASRM, 2012)<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> American Society for Reproductive Medicine. (2012). Diagnostic evaluation of the infertile male: a comite opinion. *Fertility and Sterility*, 98: 294-301.

También afectan a la fertilidad las enfermedades sistémicas, algunas patologías endocrinas como la diabetes, el hipotiroidismo, el hipogonadismo o una insuficiencia renal, hepática o cardíaca (Boissonnas et al., 2013). A veces la infertilidad es un síntoma de enfermedades adquiridas o congénitas como el cáncer testicular o neoplasias hematológicas. A medida que se han ido adquiriendo mayores conocimientos en el campo de la reproducción, se han desarrollado programas para la prevención de la infertilidad, entre ellos, el diagnóstico y tratamiento precoz de patologías como la infección genital, la criptorquidia, el varicocele, los trastornos hormonales, etc. y evitar la aparición de alteraciones seminales (Winters y Walsh, 2014).

Se deben recoger datos sobre la duración de la infertilidad, como son: si han utilizado métodos anticonceptivos previos, si tiene hijos con esa pareja o anteriores, si tienen antecedentes de interrupciones voluntarias del embarazo o de abortos espontáneos y la fecha en que ocurrieron. Hay que recoger también una historia sexual completa, preguntar sobre problemas anatómicos, relaciones sexuales, frecuencia de las mismas o alteraciones en la erección o eyaculación.

El varón deberá someterse a un estudio analítico sanguíneo básico, hormonal y serológico. Es conveniente también realizar un urocultivo, si el paciente comenta cuadros repetidos de infecciones urinarias. Además, para completar la historia clínica se debe realizar una exploración física detenida con la intención de detectar rasgos fenotípicos normales o anormales, la presencia o ausencia de vello corporal, virilización, talla, distribución de la grasa, etc. Todo ello puede orientarnos hacia determinados síndromes, sin olvidar la exploración física de los genitales, tanto del pene como de los testículos, valorando su tamaño y consistencia y la correcta presencia de conductos deferentes (Teppa-Garrán y Palacios-Torres, 2004).

El siguiente paso en el estudio del varón será realizar un seminograma, es decir, un estudio básico seminal. Es una prueba fundamental y con ella comienza la investigación de la posible participación masculina en la responsabilidad de la esterilidad. Se basa en la evaluación de los parámetros seminales clásicos publicados por la OMS (*Laboratory Manual for the examination and processing of Human Semen*, 2010)<sup>4</sup>, siendo algunos de ellos: el volumen, la licuefacción, pH, recuento espermático, la movilidad, morfología y vitalidad. Los valores de referencia de estos parámetros se muestran en la siguiente tabla:

---

<sup>4</sup> World Health Organization. (2010). WHO Laboratory Manual for the examination and processing of Human Semen. Department of Reproductive Health and Research. Ginebra, Suiza

**Tabla 1:** Valores de referencia para el seminograma según la OMS.

| VARIABLES                                | Valor de referencia |
|--|---------------------|
| Concentración total                      | ≥ 20                |
| % de espermatozoides móviles progresivos | 32-100              |
| % de espermatozoides móviles             | 39-100              |
| % de vitalidad                           | 58-100              |
| % de morfología normal                   | 4-100               |

A partir de los datos obtenidos en el seminograma se puede llegar a un primer diagnóstico. En él se utilizan los siguientes términos: espermia, se refiere al eyaculado total, mientras que el término zoospermia hace mención a los espermatozoides. Así, cuando el volumen del semen es cero, se denomina aspermia y, si no hay espermatozoides en el eyaculado, azoospermia. Oligozoospermia significa una concentración espermática reducida. Astenozoospermia es cuando hay baja motilidad. Teratozoospermia cuando los espermatozoides presentan alteraciones en la forma. Necrozoospermia se emplea cuando hay espermatozoides muertos. Normozoospermia es el término usado cuando hay normalidad en todos los parámetros. En general, la mayoría de los andrólogos utilizan combinaciones de estos términos.

#### **4. Genómica, proteómica y metabolómica en el estudio de infertilidad masculina.**

Recientes estudios han demostrado el incremento de desordenes genéticos relacionados con la infertilidad masculina por su efecto a diferentes niveles, como son la generación de células germinales o el proceso de maduración de los espermatozoides (Cassuto et al., 2012). En un principio se le atribuyó a las causas genéticas un 5% de los casos de infertilidad masculina, aunque en estudios más recientes (Pizzol et al., 2014) se habla de un 10 o 15%. El origen puede ser complejo, tal como aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas (Cram et al., 2001; Ferlin et al., 2007; Krausz y Giachini, 2007). Mediante el estudio del cariotipo, se pueden detectar anomalías cromosómicas, por ejemplo, aberraciones numéricas euploides y aneuploides por la falta o exceso de cromosomas, mosaicismos, cuando existen varias poblaciones celulares diferentes en un mismo individuo y aberraciones estructurales, si existen alteraciones en los reordenamientos cromosómicos constitucionales o adquiridos en al menos una banda cromosómica (equivalentes a 103-104 kilo bases). La prevalencia de alteraciones en el cariotipo está directamente relacionada con la severidad del fallo durante la espermatogénesis, ya que se traduce en una segregación alterada durante la misma, siendo más frecuentes, cuando el número de espermatozoides obtenido tras la realización de un seminograma es menor de 10 millones por mililitro (Frühmesser et al., 2013), en los casos de hipogonadismo hipergonadotrópico o en los hombres mayores de 40 años. La eliminación de un factor genético se realiza de forma rutinaria realizando un cariotipo, estudio de microdelección presente en el cromosoma Y, así como la determinación de si el paciente es portador del gen de la fibrosis quística o CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

Las alteraciones más comúnmente detectadas en el cariotipo son el Síndrome de Klinefelter, Síndrome de Turner o las trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21. En pacientes oligozoospermicos y azoospermicos la incidencia de anomalías cromosómicas es mayor. Hay estudios que defienden que se incrementa hasta el 10% (Cocuzza et al., 2013). Un ejemplo de esto podría verse en el síndrome de Klinefelter (cariotipo 47XXY), es la alteración del cariotipo más frecuentemente detectada en pacientes infértiles; si en la población normal la

incidencia es del 0,1%, esta aumenta hasta el 0,7% en varones oligozoospermicos y un 1% en el caso de azoospermicos.

Otras aberraciones que se pueden detectar mediante el estudio del cariotipo incluye: translocaciones, inversiones y otras anomalías estructurales, siendo las primeras las más frecuentes (4 a 10 veces) en pacientes infértiles (Oracova et al., 2013). De ellas, las translocaciones robertsonianas son las más frecuentes, se producen por la fusión de dos cromosomas acrocéntricos (cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22) quedando unidos en uno, por tanto los individuos portadores de este tipo de translocaciones tienen 45 cromosomas en lugar de 46.

En translocaciones recíprocas se producen espermatozoides desbalanceados por errores en la segregación de cromosomas durante la meiosis pero sin que se afecte el número total de cromosomas. Este tipo de alteraciones está relacionado con una menor probabilidad de fecundación, aunque en algunos casos también se puede llegar a fecundar un óvulo y formar un embrión que será portador de estas anomalías cromosómicas, siendo posible que no produzca embarazo, que dé lugar a un aborto o que se produzcan daños en el feto, que podrán ser de leves a muy graves dependiendo de la alteración cromosómica que se haya producido (May-Panloup et al., 2001; Iammarrone et al., 2003; Kennedy et al., 2011).

La mayoría de casos de azoospermia obstructiva o ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes son provocados por la presencia de mutaciones en el gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulador*).

Una alteración génica bien conocida es la presencia de microdelecciones en el brazo largo del cromosoma Y, siendo esta alteración la anomalía más comúnmente relacionada con desórdenes testiculares. En varones con oligozoospermia severa idiopática se detectan en un 14 % de los casos y en un 16% para azoospermia no obstructiva idiopática. Este tipo de alteración produce un alto porcentaje de espermatozoides aneuploides, lo que se relaciona con problemas en la fecundación (Dohle et al., 2002).

En pacientes con oligozoospermia severa o azoospermia debe ser estudiado el cariotipo, la presencia de mutaciones en el gen *CFTR* y deleciones del cromosoma Y (Alonso et al., 2009).

En los últimos años se le ha dado bastante importancia a estudios sobre la integridad del ADN, como defectos en la protaminación y empaquetamiento de ADN o fragmentación del propio ADN, ya que la presencia en espermatozoides se ha relacionado con una disminución de su pronóstico fértil (Balasuriya et al., 2011; Alfarawati y Wells, 2013). La proporción de estos defectos es mayor en pacientes que asisten a consulta por problemas de infertilidad que en aquellos con fertilidad probada, también se ha demostrado que es mayor en pacientes con seminograma alterado (Agarwal y Said, 2003; Cruz et al., 2010; Cassuto et al., 2012).

La detección del ADN fragmentado en pacientes *a priori* normales, pero que no consiguen una gestación en sus parejas (Cruz et al., 2010), lo elevaron como un posible nuevo marcador de infertilidad masculina. Pero su utilidad, en los últimos estudios, está siendo discutida por la falta de estandarización de los métodos de detección y por la heterogeneidad en los resultados, incluso en un mismo paciente donde los valores pueden variar por factores que afectan a la determinación, por ejemplo, el tiempo de procesado de la muestra.

Actualmente, el estudio del factor masculino se ha ampliado con el hallazgo de nuevos conocimientos acerca de procesos involucrados en la capacidad fértil del espermatozoide, porque los parámetros clásicos no aportan una suficiente información acerca de la habilidad fecundante del varón, esta ampliación se ha hecho mediante estudios genéticos y otros basados en la biología molecular (Stahl et al., 2012; Olsen y Ramlau-Hanse, 2014). Algunas pruebas diagnósticas disponibles para detectar anomalías genéticas a parte del análisis del cariotipo. La técnica FISH (*fluorescence in situ hybridization*) se usa para determinar especialmente alteraciones cromosómicas y aneuploidías (Pizzol et al., 2014; Esteves et al., 2014) ocurridas durante la meiosis en la línea germinal. Una técnica, que está cobrando en los últimos años gran interés, es CGH-arrays (comparative genomic hybridatio arrays), mediante ella se pueden detectar de forma simultánea aneuploidías y alteraciones de todos los cromosomas de una célula espermática (Harper y Sengupta, 2012).

El uso de nuevas técnicas de genética, proteómica y metabolómica (ómicas), que abarcan la búsqueda de nuevos biomarcadores (Nicholson y Lindon, 2008; Lamb, 2010; Kovac et al., 2013), puede ser la clave para diagnosticar y tratar con mas precisión la infertilidad masculina. Los biomarcadores son indicadores de un proceso biológico, sirven para detectar una enfermedad (marcador diagnóstico), su evolución (marcador pronóstico) o para elegir un tratamiento (marcador predictivo).

Existe gran interés en el transcriptoma del espermatozoide como fuente para desarrollar marcadores de la infertilidad masculina a partir de proteínas específicas (García-Herrero et al., 2010; Altmäe y Salumets, 2011). Estos enfoques han proporcionado una mayor comprensión de la función de los genes y proteínas que participan en procesos como la motilidad, la capacitación, la reacción acrosómica y la fertilización (Ashrafzadeh et al., 2013). Estudios en el proteoma de espermatozoide han demostrado que las modificaciones posteriores a la traducción, tales como la fosforilación, la glicosilación, las escisiones proteolíticas, e incluso, las mutaciones logran cambiar la función fisiológica de los espermatozoides (Patassini et al., 2013; Oliva y Castillo, 2011). Un ejemplo es el estudio de la JC-1, un marcador de la función normal de la mitocondria de los espermatozoides. El estatus mitocondrial es importante para la producción de ATP en la mitocondria, clave para el movimiento del espermatozoide. La JC-1 está localizada normalmente en agregados dentro de la mitocondria, si no hay un buen potencial de membrana puede liberarse al citosol, de este modo, su detección en esta ubicación nos indica una pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial, siendo éste uno de los desencadenantes de la apoptosis (Paoli et al., 2011). Otro marcador de la entrada de la célula en muerte celular es la translocación de la fosfatidilserina desde la membrana interna a la externa citoplasmática que puede detectarse mediante citofluorimetría. (Barroso et al., 2002).

Diversos estudios proteómicos sobre la expresión de determinados genes y su implicación en diferentes procesos celulares nos pueden aportar información sobre la buena o la defectuosa función espermática, como son los genes proapoptóticos que favorecen, desencadenan o se relacionan con la entrada de la célula en el proceso de muerte programada (Aziz et al., 2007), y los antiapoptóticos o genes *de supervivencia celular* (Cisternas y Moreno, 2006, Sakkas et al., 2002). Se han publicado estudios en los que se ha buscado una expresión proteica diferencial en diferentes grupos de varones (Martínez-Heredia et al., 2008, Thacker et al., 2011). Dentro de los llamados genes de supervivencia celular se encuentra el

gen responsable de la codificación de la proteína clusterina.

A nivel metabólico, se están desarrollando estudios pioneros para encontrar biomarcadores de la infertilidad masculina (Deepinder et al., 2007; Courant et al., 2013). Hay un reciente interés por relacionar la presencia de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) con alteraciones en la madurez espermática. Los ROS son metabolitos de oxígeno que incluyen al anión superóxido, al peróxido de hidrógeno, a los radicales hidroxilos, al radical hidro-peróxido y al óxido nítrico. Estos metabolitos oxigenados son mediadores de la función normal del espermatozoide que están implicados en el proceso de la capacitación y de la reacción acrosómica (O'Flaherty et al., 2005). Un incremento de ROS provoca daño oxidativo que influye a nivel de lípidos, proteínas y ADN, lo que se traduce en un descenso de movilidad, daño en la membrana acrosómica y en la reducción de la capacidad fecundante en el espermatozoide (Aitken et al., 2014). Por lo que se ha detectado mayor producción de ROS en espermatozoides con una cabeza anormal, en los cuales, además, la producción de ROS es diferente según el estadio de madurez que presenten. Un estudio pionero presentado en la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva en 2006 por el grupo de Agarwal, demostró el papel potencial del perfil metabólico, estableciendo biomarcadores de estrés oxidativo como herramienta diagnóstica para evaluar la funcionalidad y calidad del semen. La existencia de biomarcadores de estrés oxidativo, se consideró el primer paso de la metabólica como herramienta diagnóstica (De Iuliis et al., 2006).

## 5. Clusterina

La clusterina fue descrita por primera vez por Murphy et al. en 1988, en células de Sertoli de rata, cuyo genoma presenta una gran similitud con el humano. Es una glicoproteína heterodimérica presente en diferentes especie animales y en todos los fluidos corporales. Interviene en diferentes procesos como pueden ser la regulación del complemento, el metabolismo y transporte de los lípidos, los mecanismos de adhesión y secreción celular, la remodelación de membranas, la inmunoregulación, la muerte celular programada (Pearse et al., 1992; Dubin y Stoppani, 2000), el desarrollo neuronal y la fisiología reproductiva masculina (Atlas-White et al., 2000).

En humanos, encontramos diferentes homólogos: APOJ (apolipoproteína J) (Michel et al., 1997); SP-40,40 (proteína asociada al complemento SP40) (Kirszbaum et al., 1989); gp80; glicoproteína III; SGP-2 (glicoproteína sulfatada 2) (Sensibar et al., 1993); TRPM-2 (mensajero prostático represor de testosterona-2) (Buttyan et al., 1989); T64; XIP8 (proteína 8 inducida por radiación) (Yan et al., 1999), también conocida como KUB1 (Yang et al., 1999); NA1/NA2 (proteína asociada a lipoproteína de alta densidad) (James et al., 1991); CLI (inhibidor de la lisis del complemento) (Jenne et al., 1991).

### 5.1. Gen de la clusterina y productos de transcripción.

La clusterina humana es una proteína altamente conservada de 80 Kilo Dalton (kDa) y 449 aminoácidos (Aas). Está localizada en el cromosoma 8, brazo corto: p12 y p21 (8p21.3-p12), en la banda negativa entre las pares de bases (pb) 27510369 y 27528244 (Figura 1). Su ARN mensajero (ARNm) es de 2 Kilo bases (Kb) aproximadamente (Fink et al., 1993).

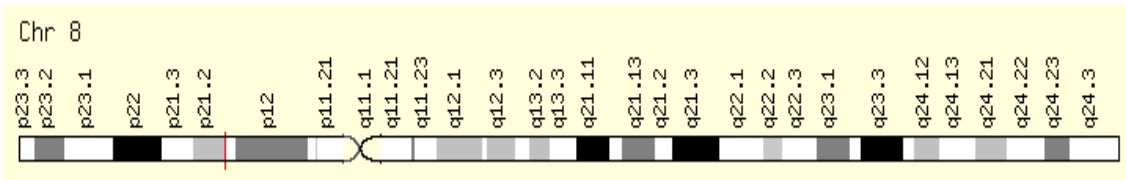


Figura 1: Localización cromosómica de la clusterina.  
Fuente: <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?CLU>

Se organiza en 9 exones y 8 intrones, siendo el tamaño de los exones desde 47 pb (exón 1) a 412 pb (exón 5), comprendiendo un total de 16580 pb (17.875 Kb). Se ha observado la existencia de una región del ADN rica en nucleótidos guanina y citosina, susceptibles de metilación y posterior expresión del gen de clusterina. La proteína puede sufrir alteraciones (glicosilaciones) en su procesado, relacionadas con una función protectora celular (Stewart et al., 2007).

En humanos y chimpancés, se ha producido una reciente actualización en el GenBank<sup>5</sup>, describiéndose dos isoformas de la transcripción del gen, la Isoforma 1 y la Isoforma 2 (NM\_001831.2 y NM\_203339.1, respectivamente), que se forman a partir de dos sitios de inicio de transcripción alternativos (Rizzi et al., 2009). Además, se ha descrito una tercera transcripción, la Isoforma 11036, a partir de la base de datos ASAP (*Alternative Splicing Annotation Project*) (Lee et al., 2003). Estos tres principales transcritos del gen dan lugar a tres productos de transcripción que tienen 9 exones, 8 intrones y un extremo terminal 3'-UTR. Cada uno de los transcritos tienen un único y propio exón 1, pero comparten la secuencia desde el exón 2 hasta exón 9 (Fig. 2), probablemente tienen inicios de transcripción diferentes, por lo tanto la teoría de que la transcripción del gen de la clusterina (CLU)<sup>6</sup> produzca una transcripción única ha quedado obsoleta. Estas tres principales formas de transcripción, aunque están estrechamente relacionadas, es muy probable que tengan diferentes funciones y distintas localizaciones (Moretti et al., 2007; Zhang et al., 2006).

<sup>5</sup> Base de datos de acceso abierto, donde se publican todas las secuencias de nucleótidos y sus traducciones a proteínas.

<sup>6</sup> CLU abreviatura gen de la clusterina.

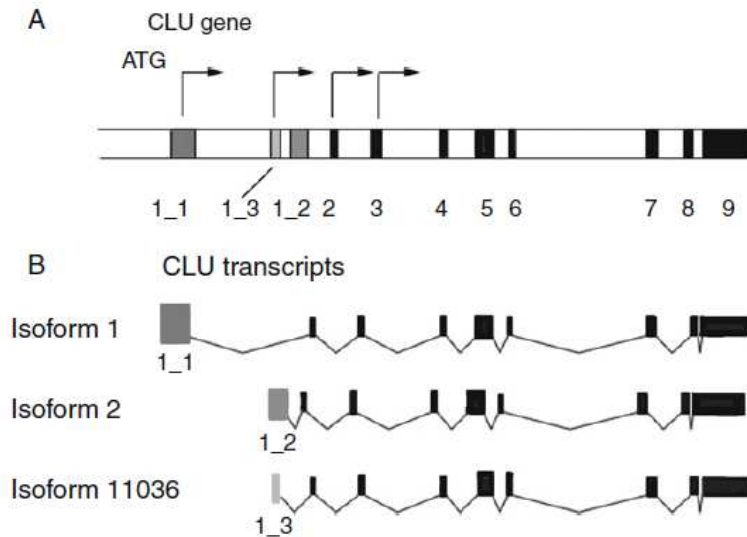


Figura 2: Clusterina: gen y transcritos. A: Esquema del gen en el cromosoma 8 en humanos, las fracciones negras representan los exones del 2 al 9, comunes en todos los transcritos. Las fracciones grises representan el exón 1 de las diferentes variantes; (1\_1) Exón 1 de Isoforma 1, (1\_2) Exón 1 de Isoforma 2, (1\_3) Exón 1 de Isoforma 11063. B: Esquema de las variantes conocidas de ARNm de CLU.

## 5.2. Isoformas de la clusterina.

La clusterina es una proteína sérica que presenta distintas isoformas, en función del compartimento celular en el que se localice. El *pool* de clusterina secretado al exterior celular se denomina clusterina de secreción (sclu), mientras que otras isoformas de clusterina se observan en el núcleo o citoplasma celular denominándose clusterina nuclear (nclu) o clusterina citoplasmática (cclu) (Leskov et al., 2003; O'Sullivan et al., 2003; Scaltriti et al., 2004; Caccamo et al., 2006; Shannan et al., 2006; Nizard et al., 2007). Se expresa en la mayoría de los tejidos de los mamíferos y es de las proteínas mayoritarias en los fluidos fisiológicos incluyendo plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, semen y leche materna.

La traducción del precursor de sCLU, se produce desde el primer codón AUG del ARNm de clusterina y es transportado al retículo endoplasmático rugoso (RER) mediante la cadena del péptido señal, posteriormente es cortado y glicosilado en el aparato de Golgi. El resultado es una proteína de secreción de aproximadamente 75-80 kDa con 5 enlaces disulfuro entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Choi-Miura et al., 1992). La secreción de la proteína se produce mediante la liberación de vesículas secretoras por rutas no reguladas a través de un receptor endocítico, el LRP-2. Ha sido muy estudiada y prácticamente todo lo que se conoce de la clusterina es de la

forma secretada.

A su vez, el precursor de la clusterina nuclear (pnCLU) no sufre rotura ni glicosilación y permanece en el citoplasma de la célula normal en forma inactiva, hasta que determinados estímulos la activan y transforman, volviendo al núcleo en su forma madura (nCLU)<sup>7</sup>. Se ha descrito una señal de localización nuclear (NLS) en la clusterina nuclear, entre los aminoácidos 72-81, secuencia que incorpora regiones ricas en aminoácidos básicos.

Funcionalmente, la sCLU protege a las células contra los agentes citotóxicos que inducen apoptosis, y nCLU inhibe el crecimiento celular y la supervivencia, actuando como una señal a favor de la muerte celular.

### 5.3. Expresión de la clusterina.

La expresión de la clusterina está regulada de forma muy específica en cada tipo de tejido, dada la amplia variación en los niveles de expresión en diferentes tejidos. Esta proteína es capaz de interactuar con un gran rango de moléculas y está implicada en multitud de procesos biológicos, como se ha indicado antes (ver apartado 5). Su expresión puede ser de forma constitutiva o inducible dependiendo del tejido en el que se encuentre y de la función que realice (Wong et al., 1994). Entre las proteínas con capacidad de interacción con la clusterina destacan: la proteína A4  $\beta$ -amiloide (Boggs et al., 1996; Hammad et al., 1997); proteína 1 asociada a clusterina (Takahashi et al., 2004); componentes 7, 8 y 9 del complemento (Jenne et al., 1991); Ku-70 (Yang et al., 1999; Leskov et al., 2003); leptina, receptores lipoprotéicos y apolipoproteínas (Bajari et al., 2003; Jenne et al., 1991); receptor del factor de crecimiento tumoral- $\beta$  (Reddy et al., 1996); metaloproteinasas de la matriz celular (Matsuda et al., 2003).

La expresión de clusterina es modulada por una serie de elementos como son citoquinas, factores de crecimiento y agentes inductores de estrés. Estos últimos se pueden originar por un cambio en el estado o actividad de la célula debido a factores como la variación en la circulación, secreción, producción de enzimas, expresión génica, agentes quimioterápicos y radiación ionizante y

---

<sup>7</sup> Aproximadamente 55 kDa tras un *splicing* alternativo del codón AUG del segundo ORF (marco abierto de lectura) (Shannan et al., 2006).

ultravioleta.

También se ha encontrado una mayor expresión de clusterina en algunas situaciones patológicas donde se produce una anormal muerte o proliferación celular (Kwan-Hee et al., 2003), la retinitis pigmentosa (Wong et al., 1994), gliomas, glomerulonefritis, infarto de miocardio (Trogakos et al., 2002) y artritis reumatoide (Devauchelle et al., 2006), también se incluyen estados degenerativos como el Alzheimer (Calero et al., 2005; Wu et al., 2012). Se ha encontrado una correlación entre la expresión de clusterina citoplasmática y diferentes tipos de cáncer, como son los de colon (Redondo et al., 2010), mama (Redondo et al., 2007 y 2009; Biroccio et al., 2005), próstata (Califice et al., 2004), testículo (Tang et al., 2013), laringe (Redondo et al., 2006), faringe (Zhang et al., 2003), pulmón (Cao et al., 2005), riñón (Kurahashi et al., 2005), páncreas (Mourra et al., 2007; Xie et al., 2002), cérvix (Lokamani et al., 2011), ovario (Hassan et al., 2011), esófago (He et al., 2004), carcinoma hepatocelular (Kang et al., 2004; Aigelsreiter et al., 2009), melanoma (Hoeller et al., 2005; Shannan et al., 2006) y linfomas (Saffer et al., 2002).

#### **5.4. Función de la clusterina**

Como ya hemos dicho anteriormente esta proteína interviene en multitud de procesos fisiológicos, tanto en una función normal de la célula como en diferentes situaciones patológicas, por tanto dicha función dependerá del tipo de célula en que se exprese y de los mediadores que la regulen e interaccionen con la misma.

##### **- *Protección celular***

La clusterina nuclear interviene en el mantenimiento celular, así como en la inducción de la apoptosis tanto en células somáticas como germinales (Yang et al., 2000; Leskov et al., 2003; Rodríguez et al., 1997; French et al., 1994). En cambio, un estímulo celular induce la sobreexpresión de clusterina citoplasmática o de secreción, con efecto antiapoptótico, interviniendo en el proceso carcinogénico (Gleave et al., 2001; Bettuzi et al., 2002; Redondo et al., 2010), y poniendo de manifiesto el papel de la proteína como inhibidor del proceso de apoptosis celular (Sensibar et al., 1993; Bettuzi et al., 2000).

La clusterina de secreción es una chaperona que posee función protectora celular (Klock et al., 2009). Uno de sus mecanismos de acción es el marcado de moléculas extracelulares que provoca que diversas células sean endocitadas y degradadas por los lisosomas (Morales et al., 1996; Stewart et al., 2007). Otro mecanismo de acción consiste en interactuar con determinadas proteínas e inhibir su precipitación frente a estímulos de estrés (Ponn et al., 2000; Humphreys et al., 1999; Dumont et al., 2002). El grupo de Strocchi defiende, en un estudio publicado en 2006, que un aumento de la expresión de clusterina puede ser una defensa fisiológica para reducir el daño celular durante una situación de estrés oxidativo celular.

La clusterina también ejerce un efecto protector frente al daño inflamatorio y apoptótico ocasionado por la pancreatitis (Savković et al., 2007). Se ha confirmado una función neuroprotectora de la clusterina por estudios en los que se ha visto que actúa como marcador de reactividad glial en astrocitos de células infectadas por el virus del SIDA (Torres-Muñoz et al., 2001) y en células cerebrales isquémicas (Wiggins et al., 2003). Se ha demostrado que la sobre-expresión de clusterina por células H9c2 isquémicas activas ejerce un efecto protector frente a la isquemia cardíaca (Krijnen et al., 2005). Strocchi en 2006 añadió que el ARNm de CLU y su sobre-expresión están involucrados en la citoprotección y la remodelación de tejidos debido al intento de las células de protegerse en condiciones localizadas de estrés (Viard et al., 1999). Actualmente se ha relacionado la clusterina con un efecto citoprotector frente a los rayos ultravioleta, mediante la interacción de la proteína con la elastina del tejido dañado, inhibiendo la precipitación de esta y el daño celular (Janig et al., 2007).

- Envejecimiento celular

Durante el envejecimiento celular, el nivel de clusterina en la célula es mayor. Diferentes estudios coinciden en que esta proteína está implicada en la regulación específica de la señal, siendo su función y lugar de acción diferente en células normales y cancerosas. Se discute el papel de apolipoproteína J (ApoJ)<sup>8</sup> durante la senescencia celular y tumorigénesis, especialmente bajo las diversas formas de la proteína intracelular y su interacción con las moléculas que participan en la transducción de señales y reparación del ADN, aumentando la posibilidad de que su sobre-expresión durante la senescencia celular podría causar una predisposición al cáncer (Trogakos y Gonos, 2002).

---

<sup>8</sup> Homologo de clusterina (ver apartado 5).

En 2011, Schrijvers et al. publicaron un trabajo en *Journal of American Medicinal Association* que muestra la correlación existente entre una alta expresión de clusterina con enfermedades degenerativas como el Alzheimer, patología donde es importante el factor del envejecimiento celular.

- Remodelación de la membrana y metabolismo lipídico

Se ha descrito que la ApoJ puede unir lípidos, siendo un componente de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) junto con la Apo A-I (De Silva et al., 1990). Tiene un papel protector frente a la arterosclerosis debido a su implicación en el transporte de colesterol al hígado (Hamada et al., 2011). En un estudio reciente se ha demostrado que la clusterina inhibe la acumulación hepática de lípidos a través de la inhibición de la expresión de SREBP-1, sugiriendo que regula negativamente la expresión de SREBP-1C y la lipogénesis hepática (Hye-Young et al., 2013).

- Interacciones célula-célula en la agregación celular

Un experimento realizado por el grupo de Tung en 1992, comparó la respuesta de eritrocitos independientes en un anclaje con células TM4<sup>9</sup>, con el fin de mantenerse en cultivo en presencia de varios sustratos elegidos, para mejorar las interacciones célula-sustrato o para disminuir las interacciones célula-sustrato. Los resultados mostraron que, al someter los cultivos a la presencia de clusterina, la agregación de eritrocitos era independiente de la naturaleza del sustrato. En contraste, la adición de clusterina resultó, en agregación de células TM4, dependiente de anclaje sólo cuando las interacciones célula-sustrato eran débiles. Estos resultados demuestran el papel de la clusterina para suscitar la interacción célula-célula. La clusterina promueve la adhesión celular al mismo nivel que la fibronectina, cuando se producen rupturas de microtúbulos o microfilamentos. Así, en lesiones hepáticas cuando se inhiben las interacciones entre células y sustrato se produce una inducción del ARN mensajero de CLU (Silkensen et al., 1996).

- Reproducción

Ya en 1984, se realizó un estudio en próstata de ratas donde tras su castración, se midió el nivel de expresión de la proteína y se detectó un alto incremento relacionado con la inducción de la apoptosis en el epitelio (Fritz et al.,

---

<sup>9</sup> Línea celular derivada de células de testículo de ratón neonatales dependientes de anclaje.

1983). El estudio de la expresión de clusterina en próstata desde entonces, se ha ampliado tanto en situación normal, como en una situación carcinogénica. Un estudio publicado por el grupo de Cochrane en 2007 sugiere que los andrógenos pueden ser citoprotectores en las células epiteliales prostáticas humanas, debido a la regulación de la clusterina, tanto en una situación normal, como en la progresión del cáncer de próstata independiente de andrógenos. Además, también está clara su implicación en el proceso de espermatogénesis y madurez del espermatozoide (O´Bryan et al., 1990 y 1994; Ibrahim et al., 2000 y 2001).

### **5.5. Papel de la clusterina en cáncer.**

Describir la funcionalidad de esta proteína nos lleva necesariamente a hablar del papel que desempeña en el desarrollo del cáncer (Serrano et al., 2009; Koltai, 2014). Se ha descrito ampliamente su implicación en diferentes tipos de cáncer (Redondo et al., 2000; Califice et al., 2004; Hoeller et al., 2005; Shannan et al., 2006; Aigelsreiter et al., 2009), ejerciendo una sorprendente doble y opuesta funcionalidad. La clusterina ejerce un papel supresor del tumor (Chaiwatanasirikul y Sala, 2011), así como una supresión sobre el factor nuclear kappa B (NF-KB), factor de transcripción esencial en el proceso de supervivencia y proliferación celular. De hecho, en ratones *knockout*<sup>10</sup> para el gen de CLU, se ha demostrado una mayor susceptibilidad al cáncer (Thomas-Tikhonenko et al., 2004; Bettuzzi et al., 2009; Chayka et al., 2009). Pero en otros estudios se describe un incremento de clusterina durante algunos tipos invasivos de cáncer, ejerciendo esta proteína como oncogen. Esta doble funcionalidad puede deberse a que realiza diferentes funciones según su localización. La clusterina nuclear presente en la célula promueve la apoptosis celular. Una sobre-expresión de la misma actúa como una señal pro-apoptótica, inhibiendo la proliferación y el crecimiento celular, lo que hace pensar que su expresión debe estar marcada por esta situación patológica.

Hay dos modelos para explicar cómo el gen CLU podría ser regulado en diferentes tumores. En uno de ellos, actúa como oncogén causando una alteración de la señalización intracelular que da lugar a la activación del gen CLU; en el otro modelo, se provoca la liberación de moléculas de señalización que modifican la expresión del gen CLU debido al microambiente en el tejido tumoral durante el

---

<sup>10</sup> Ratones a los que se ha inactivado o eliminado experimentalmente uno o más genes, son usados para estudiar la función del gen que les falta.

inicio de la apoptosis (Pucci y Bettuzzi, 2009).

### **5.6. Presencia de clusterina en el tracto reproductor masculino.**

Clusterina es una proteína multifuncional, descrita por primera vez en los tractos reproductivos de rata, carnero y búfalo (O´Bryan et al., 1990 y 1994; Ibrahim et al., 2000 y 2001). En humanos se encuentra presente tanto en tejido testicular normal como anormal, se asocia con las células de Sertoli y del epidídimo, con el lumen y células germinales. Y a nivel celular, se asocia con complejos de Golgi proacrosomal y cuerpos residuales. Su presencia es generalizada en el tracto reproductivo masculino humano, por lo que desde el inicio se consideró que muy probablemente tendría un papel en la propia espermatogénesis. (O`Bryan et al., 1994, Wong et al., 1994; Andresen et al., 2003).

El aumento de la apoptosis, como consecuencia de una disminución en la producción de testosterona, puede provocar también el aumento de la muerte programada de las células germinales y la posibilidad de infertilidad. En las células de Leydig es fundamental el proceso de apoptosis para su desarrollo y maduración. Varios genes están involucrados en la regulación de estas células, codificando diferentes proteínas: SCF/c-kit, Bcl-2 y Bcl-xl que inhiben la apoptosis; y en contraposición la caspasa-3, Fas, Bax y la clusterina que estimulan dicho proceso (Yuan y Xu, 2000).

### **5.7. La clusterina en el espermatozoide.**

La clusterina en el espermatozoide también es muy abundante (Atlas-White et al., 2000). Es sintetizada por las células de Sertoli y del epidídimo en forma heterodimérica de aproximadamente 80 kDa, secretándose al medio (Matmueller y Hinton, 1990). En el proceso de maduración del espermatozoide, durante su paso a través del testículo y epidídimo, esta clusterina secretada se une al espermatozoide (Howes et al., 1998; Sylvester et al., 1991; Jia et al., 2009; Han et al., 2012), donde experimenta una disminución de tamaño y presenta glicosilaciones en su molécula (Genevieve et al., 2009).

Las primeras uniones a espermatozoides aún inmaduros se hacen en toda la superficie del mismo (Sylvester et al., 1991; Jones y Jomary, 2002). Se creía en un primer momento que durante el proceso de maduración espermática la proteína iba migrando en su localización, quedando ubicada en la zona del acrosoma cuando el espermatozoide alcanzaba su madurez. Recientemente se ha visto que no es así, sino que una vez que se ha producido la formación del acrosoma y la madurez espermática, esa clusterina inicial unida a todo el espermatozoide se desprende y origina la síntesis de una nueva isoforma producida por el propio espermatozoide y localizada en el acrosoma (Han et al., 2012). La clusterina acrosomal está relacionada con la formación y contenido del acrosoma, de forma que una de las funciones primarias de la clusterina en el espermatozoide estaría relacionada con la integridad, estabilidad, reparación y remodelación de la membrana plasmática (Toshimori, 1998; Genevieve et al., 2009). Al interactuar con dominios hidrofóbicos extra e intracelularmente, tiene un papel importante en la remodelación de la membrana plasmática durante la madurez espermática. Por este motivo, se cree que la clusterina acrosomal, una vez producida la reacción acrosómica, interviene en las interacciones espermatozoides-ovocito durante el proceso de fecundación (Atlas-White et al., 2000), ya que está implicada en el flujo de lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide tras la capacitación.

Se ha descrito que en espermatozoides anormales morfológicamente, la clusterina se expresa en toda su superficie (Ibrahim et al., 2000) y que es diferente a la que se expresa en espermatozoides con morfología normal. Esto ocurre porque en gran medida en muchos de estos espermatozoides anormales no se ha producido bien la formación del acrosoma o aún son inmaduros (O´Bryan et al., 1994).

En muestras seminales donde se observan abundantes aglutinaciones de espermatozoides, se detecta un mayor nivel de clusterina (Carlsson et al., 2004), esto se puede traducir en que la clusterina está implicada en la unión de espermatozoides entre sí, lo que les dificultará su movimiento (O´Bryan et al., 1990) y, por tanto, su capacidad para fecundar un óvulo.

Existen, además, diferentes estudios que relacionan la expresión de clusterina con varones con un seminograma alterado y con el espermatozoide anormal:

Martínez-Heredia y su grupo en 2008, realizaron un interesante trabajo, con el fin de encontrar marcadores de expresión proteica en varones teóricamente

infértiles por un seminograma alterado. En concreto compararon varones con seminograma normal, con pacientes con una astenozoospermia diagnosticada. Realizaron un estudio de 101 proteínas, las cuales se habían relacionado con alguna función del espermatozoide como la propia espermatogénesis, el movimiento e, incluso, el proceso de fecundación en su unión al óvulo. Se realizó el estudio mediante espectrometría de masas. La comparación de todas las proteínas condujo a un grupo de 17, que aumentaban o disminuían, al comparar el grupo de donantes con el de pacientes con movilidad espermática alterada. En concreto, se detectó un aumento de clusterina.

En 2011, otro grupo (Zalata et al.) publicó que en muestras de semen de hombres infértiles se apreciaba un incremento de expresión del gen de CLU. Concretamente se observó en pacientes con la movilidad y la morfología alterada en el seminograma. Varones en los que además se observó un incremento en el índice de fragmentación del ADN. La expresión seminal de clusterina puede ser un marcador sustituto para el estrés oxidativo seminal.

Muy recientemente, en 2012 y durante la realización de este trabajo se publicó un estudio por el grupo de Han, en el que se sugirió la localización de la clusterina en el espermatozoide normal. En concreto, la determinación se realizó en la fracción de espermatozoides obtenida tras el procesado de la muestra por gradientes de densidad. Después del tratamiento de permeabilización, mediante fluorescencia, se observó la proteína en la cabeza de los espermatozoides, en la región post-acrosomal. Este grupo publicó la existencia de una proteína localizada en la membrana interna de espermatozoide normal, la cual consideran diferente, aunque con una estructura molecular similar a la sintetizada por el epidídimo y testículo. Esta forma de clusterina en la membrana interna puede ser sintetizada durante el proceso de espermatogénesis en el espermatozoide normal.

Por tanto, parece ser que hay una diferencia de expresión proteica entre el espermatozoide normal y el anormal. Reflejándose probablemente en una diferente expresión entre varones fértiles con respecto a los que no lo son. Este resultado abre un interesante campo de estudio.

## JUSTIFICACIÓN



Actualmente se ha demostrado que hallazgos en el estudio del seminograma no siempre justifican la presencia de problemas reproductivos de origen masculino. Pacientes con valores normales pueden llegar a un fallo de fecundación completo incluso bajo técnicas de fecundación *in vitro*, por tanto, resultados de normalidad en un estudio de semen no garantizan la capacidad fecundante de un varón. Además, el estudio básico seminal no nos permite actualmente distinguir con absoluta certeza entre varones fértiles o no, sólo se detectan determinadas anomalías. Por esto, es preciso profundizar en los factores relacionados con la capacidad fecundante de los espermatozoides, ampliando el estudio del semen mediante técnicas basadas en la biología celular y la genética.

Desde el año 2011, nuestro servicio además de la actividad asistencial, desarrolla una actividad investigadora en el campo de la reproducción asistida. Como se ha indicado antes, es posible que haya factores genéticos que puedan explicar la infertilidad masculina, incluso en pacientes donde *a priori* los criterios clásicos han diagnosticado normalidad, por ello el objetivo general de este trabajo será el estudio de la clusterina como un nuevo factor predictor de la capacidad fértil del varón, ya que el grado de expresión de esta proteína, presente en espermatozoides, podría relacionarse con los resultados de pruebas diagnósticas, como el seminograma e, incluso, con el éxito de un tratamiento de fecundación *in vitro*, estudiando el grado de expresión del ARN mensajero y la localización de dicha proteína.

El proyecto de investigación del que nace esta tesis doctoral fue evaluado por el Comité ético de nuestro centro en Febrero de 2012 (Anexo I). El cuál lleva por título "Estudio de genes de supervivencia en espermatozoides y relación con la tasa de fertilidad".



## OBJETIVOS



Para conseguir el objetivo general, mencionado anteriormente, en este trabajo se plantean los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Describir la localización y el grado de expresión de clusterina en espermatozoides.
- 2.- Determinar si existe relación entre la expresión de clusterina y las variables dadas por un seminograma.
- 3.- Estimar si existen diferencias de expresión entre los diferentes grupos de estudio (el grupo control y el grupo de pacientes).
- 4.- Determinar si existe relación entre la expresión de clusterina y los resultados obtenidos tras un tratamiento de fecundación *in vitro*.



## MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. Diseño del estudio.

Con la finalidad de alcanzar los objetivos planteados, se ha diseñado un estudio experimental para evaluar la expresión de clusterina en el espermatozoide, mediante inmunohistoquímica y el estudio de expresión génica por qRT-PCR. Y un análisis de los datos recogidos a partir de los resultados obtenidos tras los tratamientos de fecundación *in vitro*.

Se han tomado dos grupos de estudio, un grupo de varones fértiles (grupo control) y un grupo de varones infértiles incluidos en nuestro programa de fecundación *in vitro*. En ambos grupos se ha estudiado la expresión de clusterina en los espermatozoides de un eyaculado y la relación, si hubiera, entre dicha expresión y los resultados de un seminograma. Se han comparado ambos grupos con el fin de describir si hay una expresión de clusterina diferente. Y por último, solo en el grupo de varones infértiles, se ha estudiado si existe relación entre los resultados del tratamiento de fecundación *in vitro* al que se han sometido junto a sus parejas y la expresión de nuestra proteína de estudio.

## 2. **Ámbito de estudio.**

La Agencia Sanitaria Costa del Sol es una organización pública sanitaria que pertenece a la Junta de Andalucía y depende de la Consejería de Salud y Bienestar Social. Es parte integrante del Sistema Sanitario Público de Andalucía junto al Servicio Andaluz de Salud (SAS) y del resto de Agencias Públicas Sanitarias. Está integrada por el Hospital Costa del Sol, Hospital de Alta Resolución de Benalmádena y Centro de Alta Resolución de Especialidades de Mijas.

El ámbito territorial del Hospital Costa del Sol está delimitado por los municipios de Benahavis, Casares, Estepona, Fuengirola, Istán, Manilva, Marbella, Mijas y Ojén. La población del área de referencia del Hospital Costa del Sol (HCS) asciende a 387.026 habitantes, según la última actualización del padrón por el Instituto Nacional de Estadística realizada en Enero de 2011. El Hospital de Alta Resolución de Benalmádena atiende a la población de esta localidad, censada en la misma fecha en 63.788 habitantes.

El Hospital Costa del Sol es un centro de asistencia sanitaria especializada en docencia e investigación en ciencias de la salud, situado en Marbella. Su cartera de servicios abarca numerosas áreas clínicas especializadas, incluyendo procesos de máxima complejidad.

La Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Costa del Sol, se estableció en 2008, cuando además de conseguir una ubicación física como tal, se ampliaron también los recursos técnicos y humanos. Se constituyeron dos ejes fundamentales, la parte clínica integrada por ginecólogos del servicio de ginecología y obstetricia de este hospital, cuyo responsable y director de la Unidad es el Dr. Juan Manuel Marín, y la parte analítica y biológica que constituyó el Laboratorio de Reproducción cuya responsable es la Dra. María Luisa Hortas, Directora del Área Integrada de Gestión de los Laboratorios Clínicos de nuestro centro. La formación de este equipo multidisciplinar y la formación de un laboratorio independiente, pero integrado en el Servicio de Laboratorios Clínicos de nuestro hospital, permitió la ampliación de la cartera de servicios incluyendo, entre otros procesos, los tratamientos de fecundación *in vitro*. En estos años, la unidad de reproducción ha realizado un total de 800 ciclos de inseminación intrauterina y 480 ciclos de fecundación *in vitro*, con los que hemos llegado a alcanzar un actual porcentaje de

embarazo del 17% y 39% respectivamente, atendiendo a más de 2200 parejas que han acudido a nuestra consulta por problemas de esterilidad. Y se han realizado en nuestro laboratorio más de 3300 espermogramas, prueba diagnóstica básica para identificar la infertilidad masculina.

### 3. Sujetos a estudio:

Realizamos un estudio multicéntrico en el cual se seleccionaron 90 pacientes que se habían sometido a un tratamiento de fecundación *in vitro* junto a sus parejas entre Marzo de 2011 y Enero de 2013, de ellos, 75 pacientes se diagnosticaron y se trataron en el Hospital Costa del Sol de Marbella, los restantes en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

El grupo control estaba formado por 36 pacientes entre 30-55 años con un seminograma normal y fertilidad probada que acudieron a nuestro Hospital para un estudio andrológico de rutina en el mismo período. Estos pacientes no estaban incluidos en nuestro programa de reproducción asistida.

Todos los varones de ambos grupos firmaron un consentimiento informado, para ser incluido en el estudio.

Los criterios de inclusión para el primer grupo fueron:

1. Varones entre 28-55 años, diagnosticados o no con un factor masculino que estaban dentro del programa de fecundación *in vitro*.
2. Ambos miembros de la pareja debían seguir los criterios de inclusión previamente establecidos por la Unidad de Reproducción, siguiendo las recomendaciones de la Guía de Reproducción Humana Asistida del Servicio Andaluz de Salud, los cuales son: 2a. Parejas con esterilidad primaria. 2b. Mujer menor de 40 años que presenta alguna de las indicaciones establecidas para este tratamiento, realizando en nuestro centro un tratamiento de fecundación *in vitro*.

Se excluyeron de nuestro programa y, por tanto, del estudio las parejas que cumpliendo los requisitos anteriormente citados y después del estudio básico de esterilidad, presentaban indicación para donación de óvulos, diagnóstico genético preimplantacional (DPG) o eran pacientes serodiscordantes, ya que eran derivadas a otros centros para la realización de su tratamiento. También fueron excluidos los pacientes que estando en programa de reproducción estaban diagnosticados como azoospermicos o criptoospermicos, ya que realizaron su tratamiento de reproducción utilizando espermatozoides procedentes de una biopsia testicular o

donación de semen. Y por último, los pacientes que, al realizar la extracción de óvulos a sus parejas, o no se obtuvieran o estos resultaran no aptos para la inseminación.

El diseño del trabajo, obtención de muestras y procesado experimental se llevó a cabo según las directrices de la Ley de Investigación Biomédica (14/2007, 3 de Julio).

Todo el tratamiento de datos personales se realizó, siguiendo la legislación actual para la protección de información concerniente a personas físicas identificadas o identificables (Protección de Datos de Carácter Personal, Ley Orgánica 15/1999, 13 de Diciembre).

#### **4. Técnicas de Laboratorio.**

El grupo de pacientes entregó una muestra de semen, obtenida mediante masturbación, el mismo día que se había programado la extracción de óvulos a sus parejas. Se les exigió que respetaran las instrucciones de recogida tal y como se describen en la petición de la prueba (Anexo II. Petición de estudio andrológico). La muestra se procesó y se usó ese mismo día para la inseminación de los óvulos de su pareja mediante la técnica de microinyección. De cada una de las muestras, además, se tomó una alícuota (1,5 ml) para la realización de nuestro estudio. En el caso del grupo control, todos los pacientes entregaron una muestra de eyaculado para un control seminológico rutinario bajo las mismas condiciones que el grupo anterior, también se tomó una alícuota de 1,5 ml de muestra para el estudio.

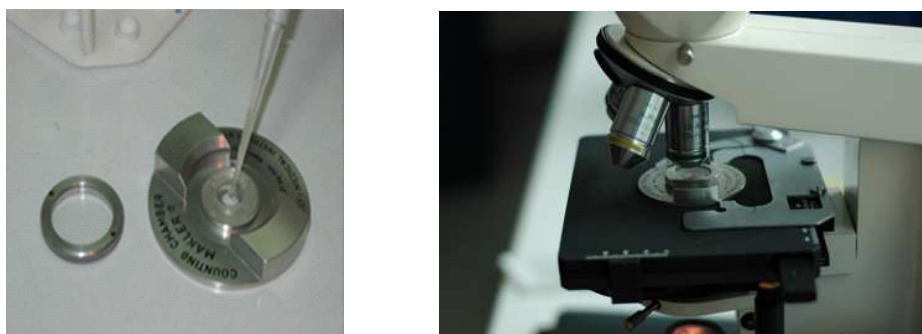
A cada muestra se le realizó un seminograma completo siguiendo las recomendaciones publicadas por las OMS (WHO Laboratory Manual for the examination and processing of Human Semen, 2010), utilizando para el estudio de concentración y movilidad espermática un sistema de conteo automático (CASA-SCA, *microptics*). A continuación, la alícuota fue centrifugada, eliminándose posteriormente el plasma seminal, se realizó el estudio de morfología para completar el seminograma y una extensión en porta para realizar la técnica de inmunohistoquímica. La muestra sobrante se congeló mediante el procedimiento habitual y se mantuvo sumergida en nitrógeno líquido para el posterior estudio transcriptómico por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR).

##### **4.1. Seminograma. Estudio del factor masculino.**

El seminograma es una prueba diagnóstica de la calidad del semen. Su finalidad es diagnosticar la fertilidad del varón y detectar problemas de esterilidad masculina. Para la realización de esta prueba el paciente debe aportar al laboratorio una muestra de eyaculado, obtenida mediante masturbación y recogida en un bote estéril. La recogida de la muestra debe realizarse después de haber transcurrido entre 4 y 6 días de abstinencia, para que los resultados sean fiables y óptimos. Se efectúa tanto un análisis macroscópico como microscópico del semen. En el examen macroscópico se evalúan las siguientes características: viscosidad, licuefacción,

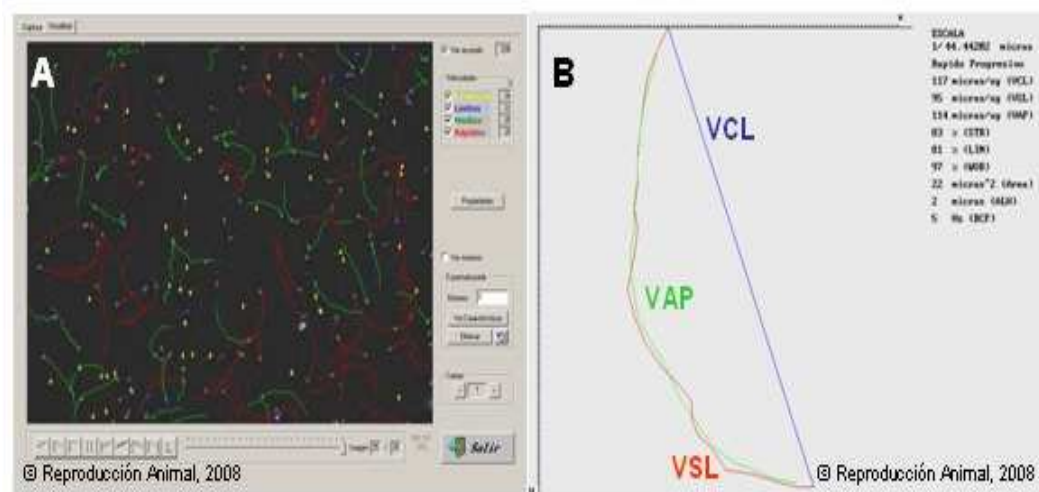
volumen, aspecto y pH, mientras que en el microscópico se evalúa: recuento espermático, estudio de movilidad, estudio morfológico y vitalidad.

**Recuento espermático y estudio de movilidad:** Dispensar una gota de aproximadamente 4,5  $\mu\text{l}$  sobre la cámara de contaje Makler (Imagen 3), previamente calentada en la pletina calefactada a 37 °C.



**Imagen 3.** Cámara de contaje Makler para la valoración de concentración espermática.

Para el cálculo de concentración se utilizan las cámaras de contaje Makler y un sistema de contaje automático (*Sistema CASA-SCA, microptycs*) acoplado al microscopio. Mediante este análisis, se obtienen los datos de concentración de espermatozoides con movilidad progresiva, concentración de espermatozoides con movilidad no progresiva y concentración de espermatozoides no móviles (Imagen 4). La suma de estas tres concentraciones nos dará el valor de la concentración total de espermatozoides de la muestra.



**Imagen 4.** Valoración del movimiento mediante el sistema de análisis de imagen computerizado (CASA). A) Detalle de la ventana de captura proporcionada por el software de movilidad del sperm class analyzer (SCA, Microptic SL). B) Representación esquemática de las velocidades calculadas para cada espermatozoide por el sistema SCA.

El siguiente paso es colocar en un tubo de fondo cónico 0,5-1 ml de muestra y añadirle el mismo volumen de medio de lavado comercial (*Gamete, Cook Medical*) con dilución 1:1, centrifugarla 10 minutos a 1700 r.p.m, retirar el sobrenadante y añadir 200-300  $\mu$ l del mismo medio de lavado. Esta alícuota de muestra lavada será la que se utilizará para el estudio de la morfología y de la vitalidad. En nuestro estudio no hemos incluido el estudio de vitalidad espermática aunque se realiza de forma rutinaria en el espermograma, por lo que no se explicará su realización en este apartado.

**Estudio de morfología:** Se prepara un frotis en un portaobjetos limpio y flameado a partir de una gota de la muestra lavada (aproximadamente 10-20  $\mu$ l), procurando que la película que se forma sea lo más fina posible y se deja secar al aire.

Para teñir el frotis se usa la tinción de panóptico rápido:

- Se sumerge el portaobjetos 10 segundos en la solución de fijación 1 (metanol).

- Se escurre el portaobjetos poniéndolo de forma vertical sobre un papel de filtro.
- Se sumerge el frotis 20 segundos en la solución I con base de colorante eosina amarillenta (roja) y se deja escurrir.
- Se repite el proceso, sumergiendo la preparación 20 segundos en la solución II, con base de colorante azul de metileno (azúl) y se deja escurrir.
- Por último, se lava la muestra con agua y se deja secar al aire.

Se deben contar no menos de 200 espermatozoides bajo el microscopio óptico y a un aumento de 100x usando aceite de inmersión, agrupándolas por categorías normales y anormales, atendiendo a la forma de la cabeza, cola y pieza intermedia (Figura 3). Teniendo en cuenta que un espermatozoide es normal (Imagen 5) cuando tiene las siguientes características:

- Cabeza: lisa, sin irregularidades, oval con una longitud 4-5  $\mu\text{m}$  desde el final del acrosoma hasta el inicio de la pieza intermedia y 2,5-3,5  $\mu\text{m}$  en su anchura, la relación longitud/diámetro 1,5-1,75 y con una región acrosomal que ocupe entre 40-70% del área de la cabeza.
- Pieza media: longitud 1,5 veces la cabeza y con una anchura menor a 1  $\mu\text{m}$ .
- Cola: única y recta, no enrollada, más estrecha que la pieza media y con una longitud de 45  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.** Esquema de diferentes morfologías espermáticas normal y anormales.



**Imagen 5.** Tinción de morfología, espermatozoide normal.

#### **4.2. Preparación de muestra seminal para un tratamiento de fecundación *in vitro*.**

La preparación de una muestra para su uso en un ciclo F.I.V. debe comenzar en menos de una hora desde su recogida.

La muestra será fraccionada en tubos de centrifuga para realizar la separación de las células seminales por centrifugación a través de gradientes de densidad. En cada tubo se coloca un volumen entre 0,2-1 ml de muestra dependiendo del recuento que se haya hecho previamente. La muestra se reparte

en tantos tubos como haga falta de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Se coloca en cada tubo el volumen estimado de gradiente de 90% (*Spermient, Cook Medical*) y a continuación se añade lentamente el volumen necesario de gradiente 45% (*Spermient, Cook Medical*) sin que lleguen a mezclarse. Encima se coloca la fracción de la muestra formando una capa definida. Se centrifuga a 1360 r.p.m. durante 20 minutos.
- Con una pipeta pasteur se retira el sedimento formado en el fondo del tubo que corresponde a la fracción de espermatozoides móviles.
- Se añade esa fracción recogida en un tubo previamente preparado con 3 ml del medio de lavado comercial (*Gamete, Cook Medical*). Todas las fracciones procedentes de los otros tubos que tengamos se recogen en este tubo. Se centrifuga durante 10 minutos a 1700 r. p m.
- Se retira todo el sobrenadante y se termina añadiendo 0,2-0,5 ml de medio de cultivo (*Gamete, Cook Medical*), lentamente dejándolo caer por la pared, para no levantar el sedimento. Se deja la muestra entre 20-60 minutos a temperatura ambiente con el fin de que los espermatozoides móviles comiencen a migrar hacia la superficie, es lo que se llama técnica de *Swim-up*.
- Se recoge la fracción superior de la muestra en un tubo y se hace el recuento de espermatozoides móviles en la cámara de conteo. Esta fracción será utilizada para la microinyección de óvulos.

#### **4.3. Inmunohistoquímica. Estudio de expresión proteica.**

La inmunohistoquímica es una técnica esencial para el estudio de tejidos y poblaciones celulares. Es muy efectiva y posee varias ventajas sobre otras técnicas, ya que permite observar al mismo tiempo los cambios o lesiones que se produzcan en las células o en el tejido a estudio, así como la molécula específica, facilitando el diagnóstico. Puede usarse en tejidos previamente fijados en formol, lo que es importante, pues se evitan los problemas de conservación. Es ampliamente

utilizada en investigación y diagnóstico de enfermedades y también en estudios de expresión y localización de antígenos específicos. Las técnicas de tinción inmunohistoquímicas (IHQ) permiten la visualización de antígenos mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo específico dirigido contra el antígeno (anticuerpo primario), un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario y un complejo enzimático con un sustrato cromogénico con pasos de lavado intercalados. La activación enzimática del cromógeno produce una reacción visible en el lugar en el que se encuentra el antígeno. Posteriormente se puede contrateñir la muestra y cubrirla con un cubreobjetos. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio. Esta técnica permite la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de antígenos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular. La aplicación directa de anticuerpos monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización microanatómica de su expresión.

**Procedimiento para clusterina:** Se coge la muestra de semen a la que se va hacer la determinación y se somete a un lavado mediante centrifugación para eliminar los restos de plasma seminal (y crioprotector, si la muestra estaba previamente congelada) añadiendo como mínimo el doble de volumen que tenga la muestra de medio de lavado (*Gamete, Cook Medical*). Se centrifuga durante 10 minutos a 1700 r.m.p. Tras el lavado se elimina el sobrenadante y el sedimento o pellet se rehidrata con el mismo medio de lavado limpio (200-300  $\mu$ l). Con esta dilución se efectúa un frotis en porta poniendo una gota de 30  $\mu$ l.

A continuación los portaobjetos se someten a la técnica de inmunohistoquímica siguiendo los siguientes pasos:

El porta se rehidrata con xileno y alcohol, se refrigera durante 15 minutos en un recipiente que contiene citrato buffer (10 mmol/l) y se bloquea la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en 0,1% de azida sódica durante 15 minutos. La expresión de la proteína se determina con un anticuerpo monoclonal anticadena alfa (*Upstate-Millipore, Watford, England*). Se incuba durante una hora. Después se lava con tampón fosfato salino o PBS. Se incuba con anticuerpo marcado con biotina y luego con estreptavidina marcada con peroxidasa. El producto de la reacción se lava con PBS y se usa como cromógeno tetrahidrocloruro de diaminobencidina. Se lava abundantemente y se tiñe con hematoxilina. Para poner a punto esta técnica tuvimos que ajustar la dilución del anticuerpo (mirar apartado 2 de Resultados: optimización de la fase experimental del estudio).

Finalmente, se preparan los portas con un cubreobjetos y se observan al microscopio. La observación y conteo de los patrones de expresión de la proteína se realiza sobre 100 espermatozoides por muestra a un aumento de 100x con aceite de inmersión.

#### **4.4. Técnicas previas al estudio de expresión génica.**

La quantitative real time-PCR (qRT-PCR) es una técnica ampliamente utilizada para estudios de expresión proteica y se basa en la reacción en cadena de la polimerasa. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico. Realizando este tipo de PCR, además de la detección del gen que interesa estudiar, se tiene una estimación cuantitativa de su expresión. Antes de realizar propiamente la qRT-PCR hay que realizar una serie de pasos previos: extracción de ARN de las células sobre las que se quiera realizar el estudio y síntesis del ADN copia (ADNc). Además, hay que realizar una serie de ajustes antes de llevar a cabo la qRT-PCR (mirar apartado 2 de Resultados: optimización de la fase experimental del estudio).

Como ya se ha descrito anteriormente, la alícuota destinada al estudio por qRT-PCR fue congelada y posteriormente descongelada para su uso siguiendo el protocolo habitual de nuestro laboratorio.

##### **4.4.1. Congelación de muestras espermáticas.**

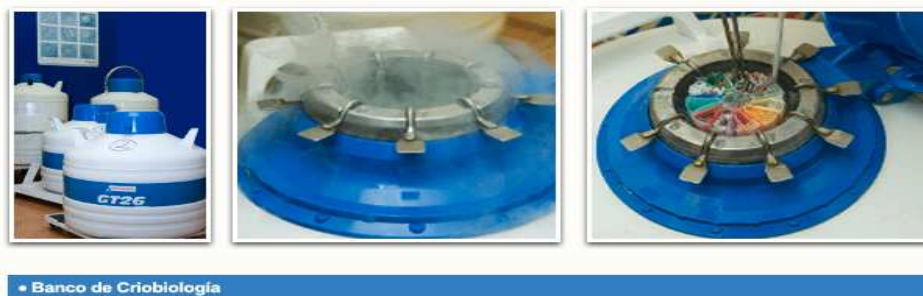
Se toma 1-1,5 ml de eyaculado, se lava con 1,5 ml de medio de lavado (*Gamete, Cook Medical*) y se centrifuga durante 10 minutos a 1700 r.p.m. Después se elimina el sobrenadante y se añade medio limpio (1 ml) resuspendiendo la muestra para eliminar el plasma seminal.

Para la congelación de la muestra usamos un agente crioprotector (*Cryosperm, Cook Medical*) y el procedimiento fue el siguiente: Se añade gota a gota 1 ml de crioprotector a la muestra preparada. Una vez añadido todo el crioprotector, la mezcla se deja 20 minutos a temperatura ambiente, después se carga la mezcla en las pajuelas de congelación (*Cryobiologic*) (Imagen 6).



**Imagen 6.** Pajuelas de congelación para muestras espermáticas.

Las pajuelas se someten a vapores de nitrógeno líquido durante 30 minutos, sumergiéndose posteriormente en el nitrógeno líquido y así, sumergidas, se mantendrán almacenadas. Identificadas, se mantienen en el banco criogénico (Imagen 7) del laboratorio de reproducción asistida hasta el momento de su uso.



**Imagen 7.** Contenedores criobiológicos donde se mantienen almacenadas las muestras espermáticas en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4.2. Descongelación de muestras espermáticas.**

Se sacan las pajuelas necesarias del criocontenedor y se dejan en la estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Posteriormente la muestra se deposita en un tubo de centrifuga y se añade el mismo volumen que haya de muestra de medio de lavado (*Gamete, Cook Medical*). Se centrifuga durante 10 minutos a 1700 r.p.m. y se elimina el sobrenadante. Con la muestra deshidratada se lleva a acabo la extracción de ARN.

#### 4.4.3. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN en espermatozoides procedentes de un eyaculado, se siguió el protocolo publicado por Das et al. en 2010, usando en este caso los reactivos y protocolos de laboratorio para el *RNeasy Plus Mini Handbook de Qiagen*. Las muestras de espermatozoides previamente congeladas se descongelaron como ya se ha descrito. Una vez que se centrifuga y se lava la muestra con medio de cultivo, se elimina el sobrenadante, y sobre el sedimento sin resuspender se realiza la extracción de ARN:

1. Si la muestra tiene entre 5 y 70 millones de células se añade 600  $\mu\text{l}$  de la dilución siguiente: 10  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol en 1 ml de buffer *RLT plus*. Si tiene una concentración menor, se añaden 300  $\mu\text{l}$  de dilución.
2. A continuación se pone 1 minuto en vórtex para favorecer la rotura de las células.
3. Se transfiere el homogenizado a las columnas de eliminación de ADN genómico (ADNg). Se centrifuga durante 30 segundos a 8000 g. Se quita la columna y al volumen que nos queda se le añaden 600  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%.
4. Se transfiere la muestra a la columna de extracción de ARN en un tubo de 2 ml un volumen máximo de 700  $\mu\text{l}$  y se centrifuga durante 15 segundos a 8000 g. Se elimina el medio que ha pasado a través de la columna. Si queda aún volumen, volvemos a repetir este proceso.
5. Se añade a la columna 700  $\mu\text{l}$  de buffer *RW1* y se centrifuga durante 15 segundos a 8000 g y se descarta el sobrenadante.
6. Se añade a la columna 700  $\mu\text{l}$  de buffer *RPE* (buffer que se prepara previamente añadiendo 4 volúmenes de etanol al 96-100% a la dilución comercial), se centrifuga de nuevo durante 15 segundos a 8000 g, eliminando el volumen que ha pasado por la columna.
7. Se añaden de nuevo 500  $\mu\text{l}$  de buffer *RPE* y se centrifuga durante 15

segundos a 8000 g.

8. Se repite el lavado añadiendo de nuevo 500  $\mu$ l de buffer *RPE* y se centrifuga durante 2 minutos a 8000 g. Se elimina el medio.
9. De nuevo se centrifuga sin medio a máxima velocidad (14000 g) durante un minuto.
10. Se transfiere la columna a un nuevo tubo y se añaden 40  $\mu$ l de agua libre de RNasas. Se centrifuga durante 1 minuto a 8000 g. Se obtiene el medio que pasa a través de la membrana.
11. Se mantiene la muestra obtenida en un bloque frío.
12. A continuación se mide la cantidad de ARN de la dilución en el *NANO-DROP (Termo)*. Las muestras de ARN se almacenan congeladas a -20 °C.

#### **4.4.4. Síntesis del ADNc.**

Para la transcripción inversa y obtener el ADNc, se realizó el siguiente protocolo siguiendo las indicaciones del protocolo comercial *iScript reverse transcription supermix for qRT-PCR* de la casa comercial *Bio-Rad*:

1. Se añade en un tubo estéril de 0,5 ml, 4  $\mu$ l de *iScript reverse transcription supermix* y 16  $\mu$ l de la dilución de ARN de cada una de las muestras obtenidas con el protocolo anterior para optimizar al máximo la técnica. Si alguna de las muestras no contiene 16  $\mu$ l, se completa la mezcla con agua libre de nucleasas (*Nuclease-free water*), hasta completar un volumen final de 20  $\mu$ l.
2. Se mezcla bien dando un pulso en la centrífuga. Este proceso debe hacerse en frío.
3. Se incuba la mezcla anterior en un termociclador siguiendo la secuencia: 5 minutos a 25 °C, es la fase llamada "priming"; el paso de acción de la transcriptasa reversa se amplió a 45 minutos a 42 °C y el paso de la

inactivación de la enzima fue de 5 minutos a 85 °C. Las muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su utilización.

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

A partir del ADNc para la elaboración de las curvas patrón se hace una PCR convencional con primers específicos de nuestro transcrito de estudio, para la clusterina (Homo sapiens clusterine, transcript variant 1, mRNA. NCBI Referente Sequence: NM\_001831.3) y de los dos housekeeping, 18s ribosómico y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa o GADPH (Amoako et al., 2012). Los primers usados para la clusterina fueron el *Forward* 5'-CCAACAGAATTCATACGAGAAGG -3' y el *Reverse* 5'-CGTTGTATTTCTGGTCAACCTC-3'; para el 18S Ribosómico (18S Rib), las secuencias fueron la siguientes: *Forward* 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT -3' y *Reverse* 5'-CCATCCAATCGTAGTAGCG-3'; para el GADPH: *Forward* 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA -3' y *Reverse* 5'-CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT -3'. Todos se construyeron con el programa informático *Primer3* y fueron proporcionados por la casa comercial Sigma Aldrich.

Se realizó la PCR siguiendo el protocolo de *Hot Start Taq DNA Polymerase* de *Qiagen*. Los volúmenes de reacción que se usaron tanto para el 18S ribosómico, el GADPH y la clusterina se indican en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Mezcla de la reacción de PCR para 18S ribosómico, GADPH y clusterina.

|                            | <b>Reactivo</b>          | <b>Volumen (μl)</b> |
|----------------------------|--------------------------|---------------------|
| Composición de la reacción | Template cDNA            | 8                   |
|                            | Buffer 10x               | 10                  |
|                            | MgCl <sub>2</sub>        | 4                   |
|                            | dNTPs                    | 5                   |
|                            | Primer F                 | 2                   |
|                            | Primer R                 | 2                   |
|                            | Agua Destilada           | x                   |
|                            | Hot Start Taq Polimerasa | 0,5                 |
|                            | Volumen final            | 100                 |

Una vez hecha la mezcla de reacción se llevó al termociclador para realizar el programa de PCR. Comienza con una etapa inicial de activación de 15 minutos a 95 °C, después se realizan 35 ciclos de tres pasos: 30 segundos a 94 °C para la desnaturalización, 30 segundos a 58 °C y 15 segundos a 72 °C para la extensión. Después de la repetición de ciclos, se produce una etapa final de extensión, 10 minutos a 72 °C, manteniendo finalmente la muestra estable a 8 °C.

#### **4.4.6. Electroforesis en gel de agarosa.**

Los transcritos obtenidos por la PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se sometieron a electroforesis durante una hora.

##### Preparación del gel de agarosa al 1%

- Se pone en un matraz 2.5 g de agarosa en 250 ml de buffer TBE 0,5X.
- Se calienta en horno microondas hasta que la agarosa esté disuelta, sin que llegue a ebullición.
- Se retira y se deja enfriar.
- Cuando se haya enfriado, se añaden 15 µl de disolución de bromuro de etidio (10 mg/ml).
- Se agita la mezcla y se vierte en el molde del gel con el soporte y el peine (15 pocillos) colocados. Se deja enfriar a temperatura ambiente.
- Se deja que solidifique por completo (mínimo 30 minutos).

##### Preparación del buffer TBE 10X (un litro) de electroforesis

- Se mezcla TrisBase (108 g), ácido bórico (55 g), EDTA 0.5M (40 ml).
- Se disuelven todos los reactivos en agua destilada hasta tener un

volumen final de 1L.

#### Preparación de la electroforesis

- Se coloca el gel en una cubeta de electroforesis que debe estar llena de Buffer TBE 10X.
- Al producto amplificado (10  $\mu$ l) se le añaden 2  $\mu$ l del buffer de carga (azul de bromofenol).
- Las muestras se cargan en los pocillos situados en el cátodo del gel.
- También se cargará el marcador de peso molecular interno, PM VI con los rangos de 154-2176 pares de bases (*Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Alemania*), en uno de los pocillos de los extremos del gel.
- Se someten a una corriente eléctrica de 70 voltios y 19 amperios durante aproximadamente 40 minutos.

La matriz porosa formada permite la separación de las moléculas por el tamaño mediante la aplicación de una corriente eléctrica. Una vez completa la electroforesis y las moléculas más pequeñas han llegado al ánodo, se visualiza el patrón de migración del ADN con un transiluminador ultravioleta.

#### **4.4.7. Gen Clean.**

Para extraer y purificar el resultado obtenido tras la electroforesis en gel de agarosa, usamos el kit de purificación *Illustra GFX PCR DNA and Gel band Purification kit (Qiagen)*. Realizando el siguiente protocolo:

- Se corta la banda que interesa del gel de agarosa y se introduce en un tubo libre de DNasa. Se toma referencia del peso del fragmento.
- Para cada muestra se añaden 10  $\mu$ l de buffer de captura tipo 3 por cada 10 mg de gel.

- Se mezcla por inversión y se incuba a 60 °C durante 20-30 minutos hasta que la agarosa se disuelva completamente. Una vez que adquiera una tonalidad amarillenta, significa que se ha disuelto completamente. Si la tonalidad es rosa oscura o roja, se debe añadir un volumen de aproximadamente 10 µl de acetato de sodio 3 M hasta pH 0,5.
- Se carga en la columna de *GFX Microspin*, la cual se pone dentro del tubo para la recogida.
- Se centrifuga brevemente para recoger el líquido en la parte inferior del tubo, dando un pulso de centrifuga.
- Se añaden 800 µl a la columna de buffer de captura tipo 3, se recoge en un tubo la columna y se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Se centrifuga durante 30 segundos a 16000 g.
- Se desecha el líquido y se vuelve a colocar la columna.
- El lavado se repite varias veces.
- Se añade buffer de lavado tipo 1 (500 µl) a la columna *GFX microspin*.
- Se centrifuga durante 30 segundos a 16000 g.
- Se elimina el líquido que haya pasado por la columna.
- Se centrifuga de nuevo durante 30 segundos a 16000 g.
- Se elimina de nuevo el líquido que pase a través de la columna.
- Se añade buffer de elución tipo 4 o tipo 6 (10-50 µl) en el centro de la membrana de la columna y se coloca debajo de la columna un tubo *ependorf* para recoger la muestra.
- Se incuba la columna durante un minuto a temperatura ambiente.

- Se centrifuga durante 1 minuto a 16000 g.
- Se elimina la columna.
- Se almacena el ADN purificado a -20 °C.
- Se mide la concentración de ADN en el *Nanodrop*.

El ADN purificado es usado como molde, con concentraciones conocidas, para realizar la curva patrón de los primers descritos. Después se realiza la RT-PCR para cada una de las muestras y se comparan con las curvas patrón para obtener un valor de expresión.

#### **4.5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).**

Para realizar la qRT-PCR se ha usado el *SsoFast Eva Green Supermix* de *Biorad*. Éste contiene: 2 buffers de reacción con dNTPs, *Sso7d-fusion polimerase*, cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), *EvaGreen dye* y estabilizadores. Para llevar a cabo la reacción, se añade también un volumen de los *primers*, tanto del *forward* como del *reverse*, un volumen de la muestra o *template* y, si fuese necesario, se completa el volumen final de la reacción a 20  $\mu$ l con agua libre de DNAsas. Se ha llevado a cabo en el termociclador *ROTOR GENE* de la marca *Qiagen*.

Para los componentes de la reacción se tomaron los volúmenes por muestra, descritos en la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Mezcla de la reacción para la qRT-PCR de 18S ribosómico y clusterina.

|                 | <b>Reactivo</b>                  | <b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b> |
|-----------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 18S ribosómico. | SsoFast EvaGreen supermix        | 10                                 |
|                 | Primers (F+R) del 18S Ribosómico | 1                                  |
|                 | Agua libre de RNasa              | 8                                  |
|                 | DNA Template                     | 1                                  |
| Clusterina.     | SsoFast EvaGreen supermix        | 10                                 |
|                 | Primers (F+R) de clusterina      | 1                                  |
|                 | Agua libre de RNasa              | 4                                  |
|                 | DNA Template                     | 5                                  |

Las muestras se someten a diferentes ciclos de amplificación siguiendo la secuencia: Un primer ciclo de activación de la enzima a 95 °C, durante 30 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 5 segundos, la etapa de extensión es también de 40 ciclos de 10 segundos en un rango de temperatura de 55-60 °C y la extensión final o *melt curve* con pasos intercalados de 10 segundos a 65 y 10 segundos a 95 °C.

## 5. Variables de estudio.

Las variables del estudio se expresan en la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Variables de estudio.

| <u>VARIABLES DEL ESTUDIO</u>                           |   |
|--|---|
| Variables de grupo                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Control</li> <li>- Paciente:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Oligozoospermicos.</li> <li>- Astenozoospermicos</li> <li>- Teratozoospermicos</li> <li>- Normozoospermicos.</li> </ul> </li> </ul>  |
| Variables para el estudio del factor masculino clásico | <p>Factor masculino, variables del seminograma:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentración de espermatozoides total. (M/ml)</li> <li>- Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos.</li> <li>- Porcentaje de morfología normal.</li> </ul>  |
| Variables moleculares                                  | <p>Expresión de clusterina por inmunohistoquímica:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Porcentaje de espermatozoides con tinción de clusterina.</li> <li>- Porcentaje de espermatozoides con tinción en acrosoma.</li> <li>- Porcentaje de espermatozoides teñidos en toda su superficie.</li> <li>- Porcentaje de espermatozoides con tinción de clusterina en pieza intermedia y/o cola.</li> </ul> <p>Expresión de clusterina por qRT-PCR.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Expresión de clusterina (delta-ct)</li> </ul> |
| Variables clínicas                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Porcentaje de fecundación.</li> <li>- Calidad de los embriones que se transfieren.</li> <li>- Test de gestación.</li> <li>- Indicación del tratamiento de reproducción. (variable de confusión)</li> <li>- Edad de la mujer. (variable de confusión)</li> </ul>  |

Las variables contempladas en el estudio y descritas a continuación, se han recogido en el formulario del anexo V.

## **5.1 Variables definidas para resultados generales y para definir grupos de estudio.**

### **Grupo experimental**

Variable dicotómica que toma valores de cada uno de los grupos de estudio: Control y paciente.

Para el análisis del objetivo 3, además de la separación del grupo experimental como varón control o varón paciente, se realizó una subdivisión para el grupo de pacientes según los valores obtenidos tras la realización del seminograma, de modo que se separaron pacientes con concentración alterada (oligozoospermicos), pacientes con movilidad alterada (astenozoospermicos), pacientes con morfología alterada (teratozoospermicos) y pacientes con seminograma normal (normozoospermicos). Cada uno de estos subgrupos de pacientes se comparó con el grupo de varones controles para evaluar la expresión de clusterina entre los subgrupos.

## **5.2 Variables definidas para el estudio del factor masculino. Seminograma.**

### **Concentración total de espermatozoides.**

Variable cuantitativa que recoge el conteo de espermatozoides de una muestra, expresado en millones por ml.

Para el análisis del objetivo 2, se recategorizó como variable dicotómica atendiendo a si el valor dado estaba o no por encima de los valores de normalidad publicados por la OMS en 2010 (*Laboratory Manual for the examination and processing of Human Semen, 5<sup>th</sup> Edition*). De este modo, se dio valor cero cuando los valores estaban por debajo del valor de normalidad (corresponde a una muestra

con diagnóstico de oligozoospermia) y uno, cuando la muestra estaba dentro de los valores de normalidad.

#### **Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos.**

Variable cuantitativa que se calcula realizando el contaje de espermatozoides móviles progresivos en una muestra y se expresa en valor de porcentaje respecto al valor de concentración total.

Para el análisis del objetivo 2, se recategorizó como variable dicotómica atendiendo a si el valor dado estaba o no por encima de los valores de normalidad publicados por la OMS en 2010. De este modo, se dio valor cero cuando los valores estaban por debajo del valor de normalidad (corresponde a una muestra con diagnóstico de astenozoospermia) y uno, cuando la muestra estaba dentro de los valores de normalidad.

#### **Porcentaje de espermatozoides con morfología normal.**

Variable cuantitativa que se calcula realizando el contaje de espermatozoides morfológicamente normales en una muestra y se expresa en valor de porcentaje.

Para el análisis del objetivo 2, se recategorizó como variable dicotómica atendiendo a los valores de normalidad publicados por la OMS, 2010. Se dio valor cero, cuando los valores estaban por debajo del valor de normalidad (corresponde a una muestra con diagnóstico de teratozoospermia) y uno, cuando la muestra estaba dentro de los valores de normalidad.

### **5.3 Variables definidas para el estudio de expresión de clusterina.**

Se incluyeron los resultados obtenidos a partir del estudio de expresión de clusterina mediante inmunohistoquímica o qRT-PCR.

### **Variables para el estudio por inmunohistoquímica.**

Para definir el objetivo 1, se establecieron los diferentes patrones de expresión obtenidos en la fase experimental, nombrándose cada uno como variable cuantitativa expresada en valores de porcentaje.

- Porcentaje de espermatozoides que expresan clusterina.
- Porcentaje de espermatozoides que expresan clusterina en el acrosoma.
- Porcentaje de espermatozoides que expresan clusterina en toda su superficie.
- Porcentaje de espermatozoides que expresan clusterina en la pieza intermedia y/o la cola.

Para el análisis de los objetivos 2 y 3, se recategorizaron cada una de ellas en variables dicotómicas, como alta o baja expresión, estableciendo el límite la mediana de la población. Siendo considerada una baja expresión cuando el valor está por debajo de la mediana y alta expresión, cuando dicho valor está por encima.

### **Variables para la expresión de clusterina por RT-PCR.**

Variable cuantitativa, expresada en valores de *delta-ct* para el análisis del objetivo 1.

Para el análisis de los objetivos 2 y 3 se recategorizaron cada una de las variables en variables dicotómicas, como alta o baja expresión relativa según la mediana de la población. En este caso, la interpretación será al contrario que en el apartado anterior. Se considera una baja expresión, cuando el valor está por encima de la mediana y alta expresión, cuando dicho valor está por debajo (ver apartado de optimización de la fase experimental para qRT-PCR).

#### **5.4 Variables clínicas. Resultados del tratamiento de fecundación *in vitro*.**

Las variables clínicas del estudio, se tomaron de los resultados del ciclo de fecundación *in vitro* que realizaron los pacientes junto a sus parejas, tales como el porcentaje de fecundación de los óvulos sometidos a inseminación, la calidad de los embriones transferidos y el resultado del test de gestación realizado tras 14 días de la transferencia embrionaria. Se analizaron también la causa de esterilidad que motivó el tratamiento, la edad de la mujer y si existía un componente de mala calidad ovocitaria como posibles variables de confusión.

##### **Porcentaje de fecundación**

El porcentaje de fecundación se calcula realizando el porcentaje del cociente entre los óvulos fecundados respecto al número de óvulos que se han inseminado.

Para el análisis del objetivo 4, se recategorizó como variable dicotómica, definida como óptimo o sub-óptimo, al porcentaje de fecundación, valor establecido como estándar de calidad por la Sociedad Española de Fertilidad (SEF 2012)<sup>11</sup>.

##### **Calidad embrionaria**

Para el parámetro de calidad embrionaria de los embriones transferidos, se evaluaron sus características morfocinéticas según los criterios publicados por la Asociación Española del Estudio de la Biología de la Reproducción (Criterios Asebir de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos, 2008). A partir de este criterio, realizamos una reagrupación creando una variable dicotómica:

- Calidad 1: Todos los embriones transferidos son de buena calidad (A y/o B, según la clasificación ASEBIR).
- Calidad 2: Los embriones transferidos son de otra calidad.

---

<sup>11</sup>Moreno et al. Indicadores de Calidad basados en el estado del Arte. XXIX Congreso SEF, 2012.

### **Otras variables clínicas:**

Para comprobar la concordancia de los datos y describir nuestra población de estudio, incluimos en el estudio las siguientes variables:

**La causa de esterilidad**, que es la que determina la derivación de la pareja a estos tratamientos:

- Factor masculino.
- Factor femenino.
- Factor mixto, cuando hay presencia tanto de un factor masculino como femenino.
- Esterilidad de origen desconocido.

**Edad de la mujer**, se han definido tres grupos en función de las expectativas de éxito en este tipo de tratamiento:

- Pacientes menores de 30 años, cuyas expectativas de éxito son mayores.
- Pacientes de 30 a 35, es el más numeroso.
- Pacientes mayores de 35 años, que suelen presentar peor calidad ovocitaria y embrionaria, ya que a partir de esta edad la capacidad reproductiva de la mujer desciende bruscamente, son las pacientes con peor pronóstico.

## 5. Fuente y recogida de datos:

Los datos necesarios para evaluar los resultados del tratamiento de fecundación *in vitro* fueron recogidos a partir de la historia clínica de la consulta de esterilidad (*software Doctor*, Anexo III) y de los registros del laboratorio de reproducción asistida (*software Lotus*, Anexos V). Los datos relativos a las variables dadas en el seminograma se obtuvieron de los informes de las pruebas complementarias del hospital que se encuentran informatizados (*software SIGLO*, Anexo IV). Los datos de expresión proteica, se registraron en una tabla excel, que se iba completando diariamente, junto a los datos anteriores (Anexo VI).

Una vez conformada la base de datos se procedió a la confirmación de aquellos registros en los que aparecían valores extremos.

## **6. Soporte informático.**

Los cálculos numéricos, gráficos y análisis estadísticos necesarios para la realización de este estudio se han llevado a cabo con la ayuda del programa *Microsoft Excel 2007* y del paquete estadístico *SPSS* versión 15.0.

Los resultados de la qRT-PCR se procesaron mediante el software incluido en el controlador del termociclador, *Rotor-Gene Experiment Q Series Software 2.1.0*.

## 7. Análisis estadístico:

### Objetivo 1

Para el primer objetivo de este trabajo: describir la localización y el grado de expresión de clusterina en el espermatozoide, se realizó un análisis estadístico mediante un análisis descriptivo con medidas de tendencia central y de dispersión para variables cuantitativas y de distribución de frecuencias para las variables cualitativas. Los datos se han acompañado de tablas y gráficos.

Las variables de expresión de clusterina fueron las siguientes:

- Porcentaje de espermatozoides con tinción de clusterina (inmunohistoquímica).
- Porcentaje de espermatozoides con tinción en el acrosoma (inmunohistoquímica).
- Porcentaje de espermatozoides con tinción en toda la superficie del espermatozoide (inmunohistoquímica).
- Porcentaje de espermatozoides con tinción de clusterina en pieza intermedia y/o cola (inmunohistoquímica).
- Expresión de clusterina medida por qRT-PCR (*delta-ct*).

A partir de este análisis obtuvimos el valor de la mediana de cada una de las variables tomadas de expresión de clusterina, que nos sirvió para recategorizar las mismas variables, obteniendo variables dicotómicas que se usaron para el análisis de los siguientes objetivos.

### Objetivo 2

Para evaluar la posible relación entre las variables que se obtienen tras realizar un seminograma y la expresión de clusterina, se realizó un análisis univariante de regresión logística mediante la comparación entre cada una de las variables dependientes con las variables independientes. Se realizó mediante el test de la Ji-Cuadrado, o el test de Fisher en caso de observaciones esperadas inferiores a 5.

De este modo, las variables dependientes tomadas fueron:

- Concentración total de espermatozoides.
- % de espermatozoides móviles progresivos.
- % de espermatozoides morfológicamente normales.

Todas ellas, tal y como se definen en el apartado correspondiente (apartado 5 de material y métodos) para este objetivo, fueron recategorizadas como variables dicotómicas tomando como referencia el valor de normalidad o anormalidad según el manual OMS de 2010 (Tabla 1).

Cada una de estas variables dependientes se comparó por separado con las variables independientes que informan sobre la expresión de clusterina en el espermatozoide:

- Porcentaje de espermatozoides con tinción de clusterina (inmunohistoquímica).
- Porcentaje de espermatozoides con tinción en acrosoma (inmunohistoquímica).
- Porcentaje de espermatozoides con tinción en toda la superficie del espermatozoide (inmunohistoquímica).
- Porcentaje de espermatozoides con tinción de clusterina en pieza intermedia y/o cola (inmunohistoquímica).
- Expresión de clusterina por qRT-PCR (*delta-ct*).

Tal y como se explica en el apartado donde se definen las variables, todas ellas se recategorizan como variables dicotómicas tomando como referencia el valor de la mediana de la población.

### **Objetivo 3**

Para evaluar si existen diferencias para la expresión de clusterina entre los grupos de estudio, se realizó, mediante el test de la Ji-Cuadrado o el test de Fisher en caso de observaciones esperadas inferiores a 5, la comparación entre la variable dependiente o grupo experimental (variable dicotómica: control y paciente) con las variables independientes que definen la expresión de clusterina:

- Porcentaje de espermatozoides con tinción de clusterina (inmunohistoquímica).
- Porcentaje de espermatozoides con tinción en acrosoma (inmunohistoquímica).
- Porcentaje de espermatozoides con tinción en toda la superficie del espermatozoide (inmunohistoquímica).
- Porcentaje de espermatozoides con tinción de clusterina en pieza intermedia y/o cola (inmunohistoquímica).
- Expresión de clusterina por qRT-PCR (*delta-ct*).

Tal y como se explica en el apartado donde se definen las variables, todas ellas se recategorizan como variables dicotómicas tomando como referencia el valor de la mediana de la población.

Posteriormente se realizó el mismo análisis, pero el grupo de pacientes fue subdividido en: oligozoospermicos, astenozoospermicos, teratozoospermicos y normozoospermicos. Cada uno de estos subgrupos se comparó con el grupo control para evaluar si existían diferencias para la expresión de clusterina. Así, de forma independiente, se tomó como variable dependiente el grupo experimental como variable dicotómica:

- Varón control versus paciente oligozoospermico.
- Varón control versus paciente astenozoospermico.
- Varón control versus paciente teratozoospermico.
- Varón control versus paciente normozoospermicos.

#### **Objetivo 4**

Para evaluar la posible relación entre los resultados obtenidos tras realizar un tratamiento de fecundación *in vitro* y la expresión de clusterina, se tuvo en cuenta para el análisis estadístico solo al grupo de pacientes. Se realizó un análisis univariante de regresión logística, mediante la comparación entre cada una de las variables dependientes con las variables independientes, mediante el test de la Ji-Cuadrado, o el test de Fisher en caso de observaciones esperadas inferiores a 5.

Como variable dependiente, se tomó por separado cada una de estas variables

dicotómicas (ver *apartado 5* de material y métodos dónde se definen cada una de las variables):

- Porcentaje de fecundación.
- Calidad de los embriones que se transfieren.
- Test de gestación.

Cada una de estas variables dependientes se comparó por separado con las variables independientes que informan sobre la expresión de clusterina en el espermatozoide, las mismas que se usan para el objetivo 2 y 3.

Por último, se realizó un análisis de regresión logística multivariante tomando como variable dependiente el resultado del test de gestación, e incluyendo el método "por pasos hacia delante" con las variables independientes de interés. Describiendo la Odds Ratio (OR) con respecto a un intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Se estableció en los diferentes análisis el nivel de significación en  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS



## 1. Descripción de la población en estudio.

Para el estudio de la población, como ya se ha descrito anteriormente, partimos de un grupo control formado por 36 varones fértiles y un grupo de 90 pacientes incluidos en el programa de reproducción asistida de nuestro hospital y del hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Para el análisis del estudio clásico del factor masculino o seminograma se tomaron los valores de referencia publicados por la OMS en 2010 (Tabla 1).

### 1.1. Grupo control.

Este grupo presentó normales todas las variables referentes al seminograma, como se describió en el apartado de material y métodos. Para la concentración total de espermatozoides, los valores oscilaron entre 226 y 50 millones por mililitro, siendo el valor medio de 135. Para el porcentaje de movilidad progresivo la media fue del 71%, oscilando los valores desde el 92% hasta el 40,5%; y para el porcentaje de morfología normal el máximo obtenido fue un 9% frente al valor mínimo que fue del 4%, el valor medio resultante fue de 5,6% (Tabla 5).

**Tabla 5.** Frecuencias de las variables del seminograma para el grupo control.

| Variables  | Estadísticos |        |       |            |
|--|--------------|--------|-------|------------|
|  | Mínimo       | Máximo | Media | Desv. típ. |
| Concentración de espermatozoides totales (M/ml)      | 50,00        | 226,00 | 135,8 | 46,06      |
| Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos    | 40,54        | 92,68  | 71,8  | 11,81      |
| Porcentaje de espermatozoides con morfología normal. | 4,00         | 9,00   | 5,6   | 1,64       |

En concordancia, este grupo presenta éxito reproductivo, por lo que asumimos para el estudio estadístico que el porcentaje de fecundación es del 100% al igual que la tasa de embarazo clínico.

## 1.2. Grupo de pacientes.

Los valores obtenidos para el grupo de pacientes sometidos a un tratamiento de fecundación *in vitro* en los resultados del seminograma fueron 70 millones por mililitro para el valor medio de la concentración total de espermatozoides, para el porcentaje de móviles progresivos 53,8% y para el valor medio del porcentaje de morfología normal 9,4% (Tabla 6).

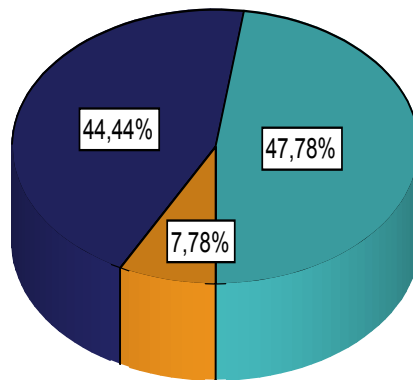
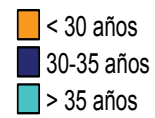
**Tabla 6.** Frecuencias de las variables del seminograma para el grupo de pacientes.

| Variables  | Estadísticos |        |       |            |
|--|--------------|--------|-------|------------|
|  | Mínimo       | Máximo | Media | Desv. típ. |
| Concentración de espermatozoides totales (M/ml)      | 0,7          | 262,0  | 70,4  | 58,3       |
| Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos    | 3,2          | 88,8   | 53,8  | 19,7       |
| Porcentaje de espermatozoides con morfología normal. | 1,0          | 25,0   | 9,4   | 5,3        |

De este modo, de los 90 pacientes que forman parte del grupo observamos que 28 presentaban algún tipo de alteración diagnóstica en su seminograma, bien sea en la concentración, la movilidad o la morfología espermática. Concretamente, ocho pacientes fueron oligozoospermicos (O), nueve astenoospermicos (A), dos teratoospermicos (T), seis oligoastenoospermicos (OA), uno oligoteratoospermico (OT), otro astenoteratoospermico (AT) y el último oligoastenoteratoospermico (OAT). El resto de los 62 pacientes de este grupo presentaron valores en el seminograma por encima de los valores normales y por tanto fueron diagnosticados como normozoospermicos.

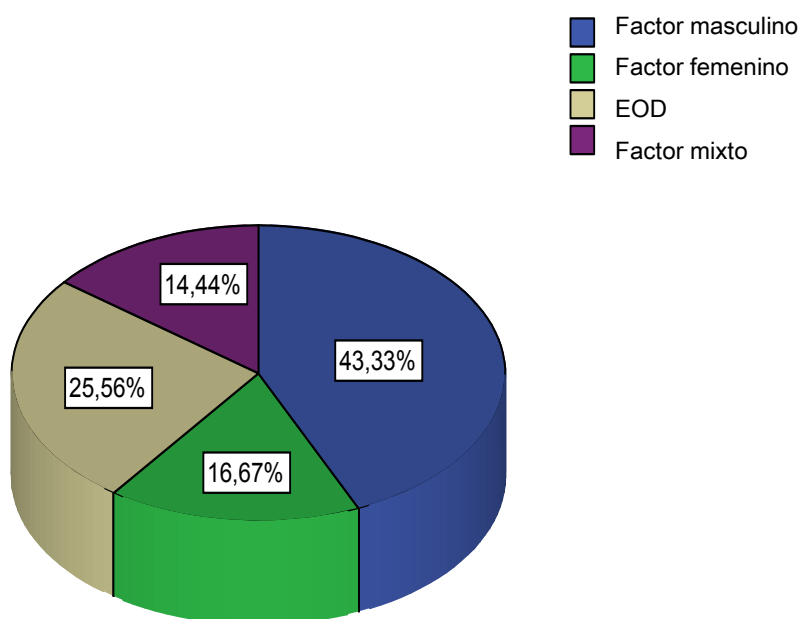
La edad media de las mujeres que se sometieron al tratamiento fue de 35 años, oscilando las edades desde 24 hasta 39 años. Siendo el grupo más numeroso de pacientes (47,7%) el que tenía más de 35 años (Gráfica 1).

**Gráfica 1: Grupo de edad de las pacientes sometidas a un tratamiento de F.I.V**



Se tuvo en cuenta, además, la causa de esterilidad por la que la pareja fue derivada al programa de fecundación *in vitro*. De acuerdo con el origen de la causa de esterilidad, los pacientes se clasificaron en cuatro grupos: causa de origen femenino (43,3%), masculino (16,7%), mixto (14,4%) o desconocido (25,6%), como se muestra en la gráfica 2.

**Gráfica 2: Causa de esterilidad diagnosticada para la derivación a tratamiento F.I.V.**



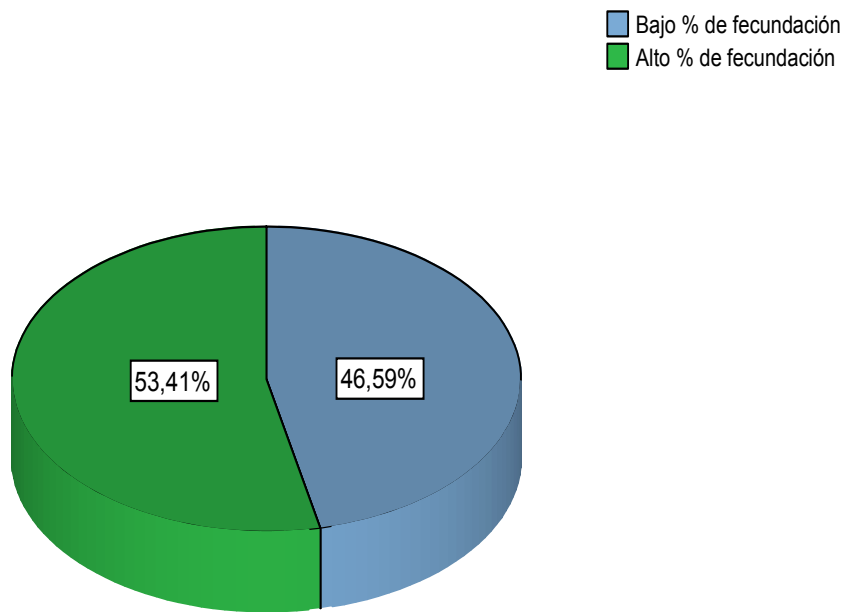
Durante los tratamientos, el porcentaje de fecundación de los óvulos sometidos a inseminación osciló desde el fallo de fecundación hasta el éxito completo (100%), siendo el valor medio de este porcentaje del 69%. Se realizó transferencias de embriones en 87,7% de los casos, para 14 de los pacientes se realizó transferencia de un único embrión y en el resto de casos se hizo la transferencia de dos embriones (Tabla 7).

**Tabla 7.** Frecuencia de la variable número de embriones transferidos.

|          | Frecuencia | Porcentaje | Porcentaje válido | Porcentaje acumulado |
|----------|------------|------------|-------------------|----------------------|
| Válidos  |            |            |                   |                      |
| 0        | 4          | 4,4        | 4,8               | 4,8                  |
| 1        | 14         | 15,6       | 16,9              | 21,7                 |
| 2        | 65         | 72,2       | 78,3              | 100,0                |
| Total    | 83         | 92,2       | 100,0             |                      |
| Perdidos | 7          | 7,8        |                   |                      |
| Total    | 90         | 100,0      |                   |                      |

Para el estudio estadístico del objetivo cuatro, como ya se describió anteriormente, se ha realizado una transformación dicotómica de alguna de las variables. De este modo, el porcentaje de fecundación se recategorizó como variable dicotómica atendiendo a los estándares de calidad recomendados por la Sociedad Española de Reproducción (Moreno et al., 2012). Definiendo como un indicador de calidad óptimo un porcentaje de fecundación cuando es superior al 67%. De este modo, se crearon dos categorías según si el valor obtenido estaba por encima o por debajo del mismo. En un 53,4 % de los casos se obtuvo una óptima fecundación (Gráfica 3).

**Gráfica 3: Porcentaje de fecundación de los óvulos inseminados mediante I.C.S.I.**

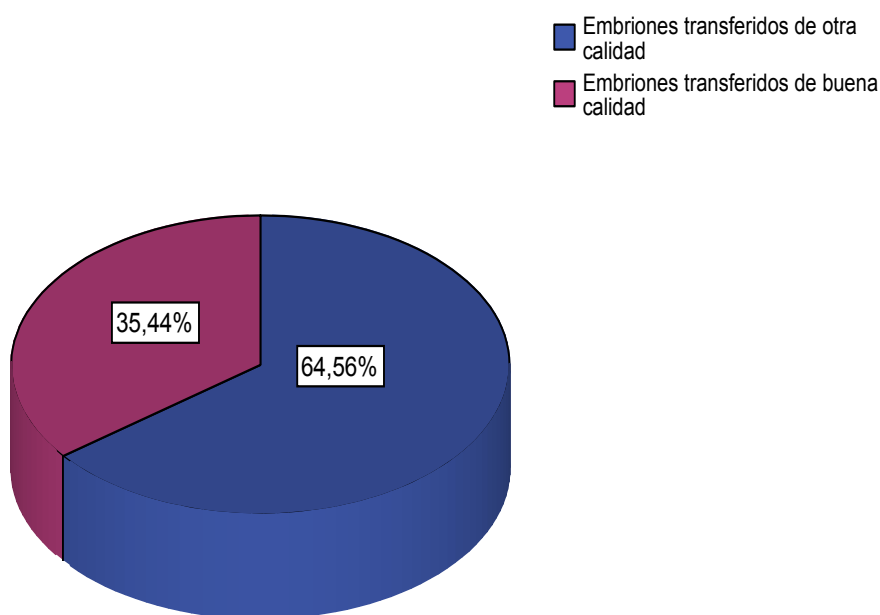


La evaluación de calidad de los embriones transferidos durante el tratamiento de fecundación *in vitro* se realizó siguiendo los criterios morfocinéticos de clasificación embrionaria publicados por la Sociedad Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción<sup>12</sup>. Por este criterio los embriones se clasifican en cuatro categorías según su calidad, que se denominan por las letras A, B, C y D, siendo la categoría A la de mejor calidad embrionaria y por tanto la de mayor

<sup>12</sup> Criterios Asebir de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos, 2008

posibilidad de implantación. En este trabajo hemos reagrupado estas calidades en dos grupos: el primero, donde todos los embriones transferidos a la paciente son de buena calidad (categorías A y/o B), y un segundo grupo, donde los embriones que se transfieren, al menos, uno no es de calidad A o B. Los porcentajes que obtuvimos fueron 35,4 y 64,6 respectivamente (Gráfica 4).

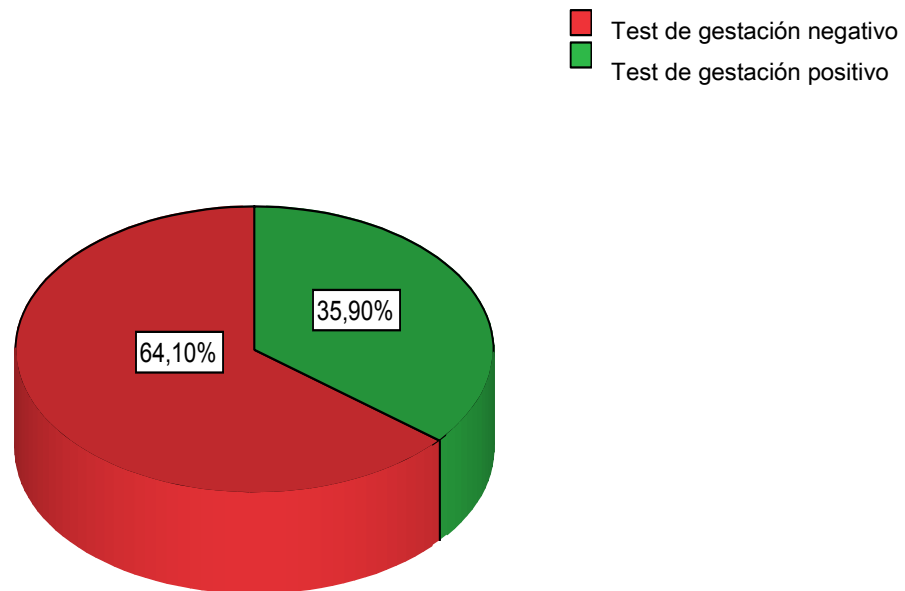
**Gráfica 4: Frecuencia de la calidad de los embriones transferidos durante el tratamiento de F.I.V.**



El éxito o no del tratamiento de reproducción fue considerado por el resultado positivo o negativo del test de gestación en orina, 14 días después de realizar la transferencia embrionaria. Como ya hemos comentado anteriormente, el

porcentaje de test de gestación positivo obtenido para el grupo de estudio fue prácticamente del 36% (Gráfica 5). La tasa de gestación clínica fue prácticamente del 36 %. (Gráfica 5).

**Gráfica 5: Frecuencia del test de gestación clínica tras el tratamiento de F.I.V.**



## **2. Optimización de la fase experimental del estudio.**

### **2.1. Ensayo por Inmunohistoquímica.**

Para la optimización de la inmunorreactividad, los factores más importantes que hay que tener en cuenta en términos generales son (Vaquero, 2007):

- Dilución del anticuerpo primario.
- Duración de la incubación del primario.
- Tipo y concentración del anticuerpo secundario.
- Técnica de recuperación antigénica empleada.
- Temperatura de incubación.
- Sistema de detección y amplificación.

En la práctica se suelen manejar tres variables: la dilución del anticuerpo primario, el tiempo de incubación del primario y la técnica de recuperación antigénica.

Además de la positividad de la diana, debe valorarse si aparece tinción de fondo. Esto se produce porque el anticuerpo no está totalmente purificado y tiene inmunoglobulinas inespecíficas, o por una titulación deficiente del anticuerpo primario y/o secundario. Para evitarlo hay que disminuir la concentración y aumentar los tiempos de exposición. En tinciones citoplásmicas deben tenerse en cuenta los falsos positivos debidos a biotina, peroxidasas y fosfatasas endógenas.

Para nuestra tinción de clusterina se realizó el protocolo descrito anteriormente. Inicialmente se procedió a la titulación del anticuerpo primario para encontrar la dilución más alta que permitiese una adecuada detección del antígeno. Se utilizaron diluciones de 1:1000, 1:2000 y 1:4000. Se llevó a cabo una evaluación subjetiva de la presencia del antígeno al microscopio. En la dilución 1:1000 se observó mucha tinción de fondo, que no permitió una clara detección del antígeno, al igual que para la dilución 1:2000. En la dilución 1:4000 se detectó mejor el antígeno, dando tinción marrón para la presencia de la proteína y tiñendo el resto de la célula azul. También mejoramos el contraste realizando la fase de pretratamiento a pH 9. Por lo que se seleccionó esta dilución para el análisis.

Para determinar la localización de la clusterina en el espermatozoide, se observaron en el microscopio los portaobjetos teñidos para clusterina (tinción de color marrón) mediante inmunohistoquímica.

## **2.2. Ensayo por qRT-PCR.**

A la hora de diseñar el estudio de expresión génica de clusterina se tuvieron que realizar algunos cambios en los protocolos originales, para optimizar los resultados obtenidos. En los pasos iniciales a la realización de la qRT-PCR, durante la extracción de ARN de las células espermáticas y síntesis de ADN copia, un factor limitante fue la baja concentración de ARN presente en el espermatozoide, a lo que hay que añadir la baja concentración de células espermáticas presentes en las fracciones de eyaculado lavadas. Hemos tenido que realizar una serie de modificaciones al protocolo comercial para conseguir una mejor extracción de ARN y evitar al máximo la contaminación por ADN genómico, sobre todo para muestras con baja concentración de células donde la obtención de ARN era muy limitada y no conseguíamos una buena síntesis posterior de ADNc. Para conseguirlo se añadió un paso intermedio de acción de una DNasa en el protocolo de extracción, así se eliminó al máximo la presencia de ADN genómico. Se añadió un paso extra en el protocolo de extracción de ARN entre los lavados (paso 5 y 6, ver apartado de técnicas de laboratorio).

Después del quinto paso del protocolo de extracción de ARN se realiza un paso extra con una enzima DNasa (*kit DNasa Set*): Se realiza una mezcla de 70 microlitros de buffer RDD con 10 microlitros de la solución de DNasa I, libre de RNasa. La solución obtenida se añade a la columna de extracción de cada muestra y se deja incubar durante 20 minutos. Después se añade un paso extra de lavado de la columna con 700 microlitros de buffer RW1, se centrifuga durante 15 segundos a 8000 g, se descarta el sobrenadante y se continúa con el sexto paso del protocolo de extracción de ARN.

Posteriormente a la extracción del material genético, se midió la cantidad mediante un espectrofotómetro compacto de ultravioleta visible para medida rápida de pureza de ADN, ARN y proteínas con micromuestras (*Nanodrop*). Se hicieron diluciones que tuvieran una cantidad de ARN de 2 microgramos ( $\mu\text{g}$ ), a partir de las cuales se creó la ADN copia.

### 2.3. Elección de genes housekeeping y elaboración de curvas patrón:

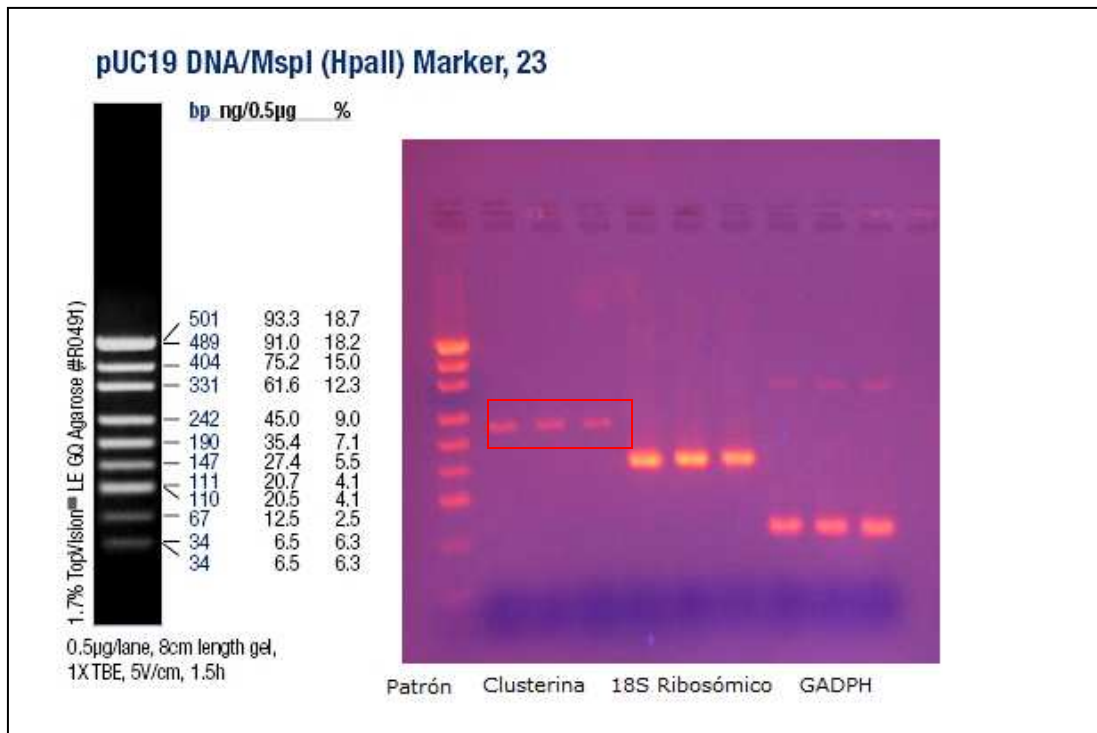
Los llamados genes *housekeeping* son genes que se expresan de forma constante en todas las células, normalmente son genes encargados del metabolismo básico de la célula, involucrados en el buen funcionamiento celular. Así, si hacemos una comparativa entre la expresión de alguno de estos genes y un gen sometido a estudio podemos cuantificar su nivel de expresión independientemente del número de copias de ADNc presente en la muestra. En un principio nosotros tomamos como *housekeeping* dos genes: 18S ribosómico y GADPH. Los primeros usados para la clusterina fueron el *Forward* 5'-CCAACAGA ATTCATACGAGAAGG-3' y el *Reverse* 5'-CGTTGTATTCCTGGTCAACCTC-3' (*Homo sapiens Clusterine, CLU, transcript variant 1, mRNA. NCBI Referente Sequence: NM\_001831.3*); para el 18S ribosómico las secuencias fueron las siguientes: *Forward* 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' y *Reverse* 5'-CATCCAATCGTAGTAGCG-3', y para el GADPH: *Forward* 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3' y *Reverse* 5'-CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT-3' (Amoako et al., 2012). Todos se diseñaron con el programa informático *Primer3*. Fueron elaborados y proporcionados por la casa comercial *Sigma Aldrich*.

Después de realizar la PCR clásica, los transcritos obtenidos se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se sometieron a electroforesis durante una hora junto con el marcador de peso molecular interno, pUC19 DNA/Mspl HpaII Marker 23 (*Thermo Fisher*), con los rangos de 34-501 pares de bases. Una vez completa la electroforesis y las moléculas más pequeñas han llegado al ánodo, se visualiza el patrón de migración del ADN con un transiluminador ultravioleta (Figura 4).

Al revelar el resultado del gel, obtuvimos una banda correspondiente al transcrito de la clusterina. Como usamos un marcador de peso molecular (PM VI), pudimos comprobar el peso molecular al que correspondía la banda para la clusterina, siendo de 428 pares de bases aproximadamente. Una banda más marcada correspondiente a la alta expresión que tiene el 18S ribosómico. Y para el GADPH obtuvimos una banda muy marcada de un alto peso molecular, pero el gel nos reveló que aparecía una banda de bajo peso, posiblemente correspondiente a una inespecificidad, lo cual se confirmó posteriormente (Figura 4).

Se extrajo cada una de las bandas del gel y se realizó un protocolo gen clean, para obtener de nuevo el material génico. Se midió la cantidad de material

genético en cada una de las muestras en el *Nanodrop*.



**Figura 4.** Gel de Agarosa 1% después de realizar la PCR clásica se ven las bandas correspondientes a clusterina (marcada con recuadro), 18S ribosómico y GADPH.

Posteriormente, se hizo una qRT-PCR con diluciones seriadas para la clusterina, el 18S ribosómico y GADPH.

Las curvas patrón se construyeron con diluciones conocidas de los transcritos purificados, tomándose diluciones 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 para cada uno de ellos. Hicimos una qRT-PCR siguiendo el protocolo anteriormente mencionado. De este modo, obtuvimos las tres curvas patrón de los tres transcritos, una para clusterina, otra para 18 S ribosómico y otra para el GADPH (Anexo VII. Imagen de curvas patrón y gráficas melting). Al observar la gráfica de la curva melting o de la temperatura de fusión de cada transcrito obtuvimos un solo pico para la clusterina y el 18S rib, mientras que para el GADPH la curva resultó con más de un pico (Anexo VII.C. Curva melting), lo que se traduce en una inespecificidad, como ya había aparecido en el gel de agarosa, donde se observaron dos bandas. Esto nos llevó a descartar definitivamente el GADPH como *housekeeping* de nuestro experimento.

Durante el desarrollo de la reacción, el número de copias de la diana al inicio de la misma se puede cuantificar con gran precisión a través del ciclo umbral (Ct)<sup>13</sup>. De esta manera, utilizando muestras patrones que contienen diluciones seriadas de concentraciones conocidas de la diana, se construye una recta de calibración que relaciona los Ct con el logaritmo de la cantidad inicial de molde. Extrapolando en esta recta los Ct obtenidos para las muestras problema, se puede estimar dicho valor. Los niveles de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad del transcrito en la muestra.

Para determinar el rendimiento de una reacción de PCR cuando se comparan diferentes condiciones de reacción, se usan entre otros los valores de la eficiencia y el parámetro  $R^2$  de la reacción. La eficiencia de la PCR es dependiente en el ensayo del rendimiento de mezcla maestra y de la calidad de la muestra. Generalmente, una eficiencia entre 0.9 y 1.1 se considera aceptable.  $R^2$  es un término estadístico que indica lo bien que un valor puede ser predictor de otro. Cuando  $R^2$  es 1, el valor de Ct se puede utilizar para predecir con precisión el valor entre dos muestras. Si  $R^2$  es 0, el valor de una muestra no puede predecirse a partir del valor de otra. Un valor de  $R^2 > 0.99$  proporciona una buena confianza en la correlación de dos valores.

En nuestro caso la eficiencia en la curva patrón de la clusterina fue de 1,13 y para el 18S ribosómico de 1.  $R^2$ , tanto para la curva patrón de la clusterina como para la del 18S ribosómico fue de 0,96. Este resultado demuestra el buen rendimiento de la reacción y la aceptación de ambas curvas patrón para la estimación del resto de las muestras (Anexo VII).

Una vez tuvimos las curvas patrón, realizamos la qRT-PCR para cada una de las muestras de estudio.

---

<sup>13</sup> El ciclo umbral es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.

#### **2.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).**

La PCR a tiempo real es una técnica ampliamente utilizada para estudios de expresión proteica. Se basa en la reacción en cadena de la polimerasa. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico. Realizando este tipo de PCR, además de la detección del gen o proteína que nos interesa estudiar, podemos tener una estimación cuantitativa de su expresión (Wasilk et al., 2004).

Se realizaron tres réplicas por muestra, un control negativo para cada una de las muestras para descartar posibles contaminaciones de las mismas y un control negativo para detectar posibles uniones inespecíficas de los *primers*, tanto para el 18S ribosómico, como para la clusterina.

Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos, ya que no podíamos calcularlo de forma absoluta por no conocer la cantidad de ADN de la que partimos, se comparó, el valor Ct de la clusterina con el valor Ct del 18S ribosómico para cada una de las muestras. La diferencia entre ambos valores permite determinar los cambios relativos en la expresión de nuestro gen problema (Rao et al., 2013). Para el cálculo de expresión de la proteína en cada muestra, nos ayudamos del software acoplado al termociclador (*Rotor-Gene Experiment Q Series Software 2.1.0*).

### 3. Localización y expresión de clusterina en el espermatozoide. Objetivo 1.

Para definir la localización y nivel de expresión de clusterina en el espermatozoide (primer objetivo de este trabajo) realizamos el análisis en todas las muestras de los dos grupos de estudio.

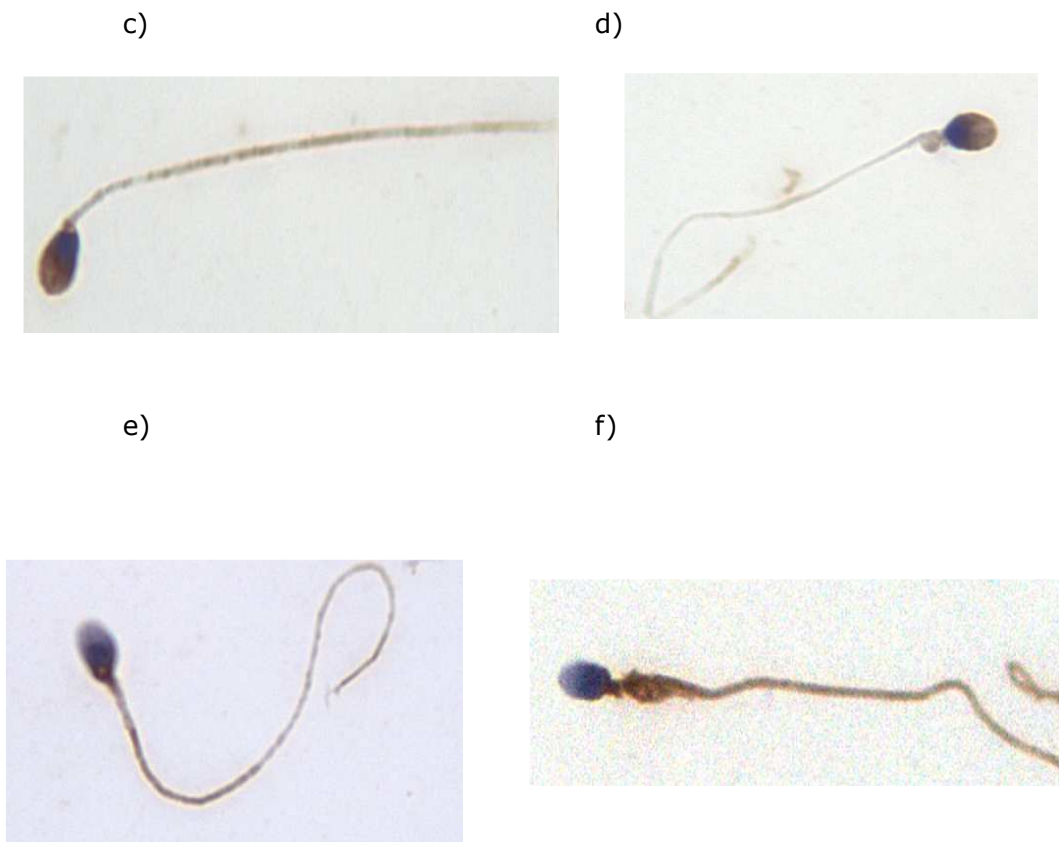
Al realizar el estudio de inmunohistoquímica para cada una de las muestras de cada uno de los grupos, se definieron diferentes patrones de expresión según la localización de la proteína dando como resultado diferentes grupos: Espermatozoides que no expresan la proteína y, por tanto, no había tinción en ellos (a), por el contrario, otro grupo de espermatozoides estaba completamente teñido a lo largo de toda su superficie (b). De forma intermedia a esas dos categorías de expresión por tinción, obtuvimos un grupo de células que presentaban tinción localizada en acrosoma únicamente o en combinación con la pieza intermedia y/o la cola (c y d) y tinciones solo localizadas total o parcialmente en pieza intermedia y/o la cola (e y f).

a)



b)

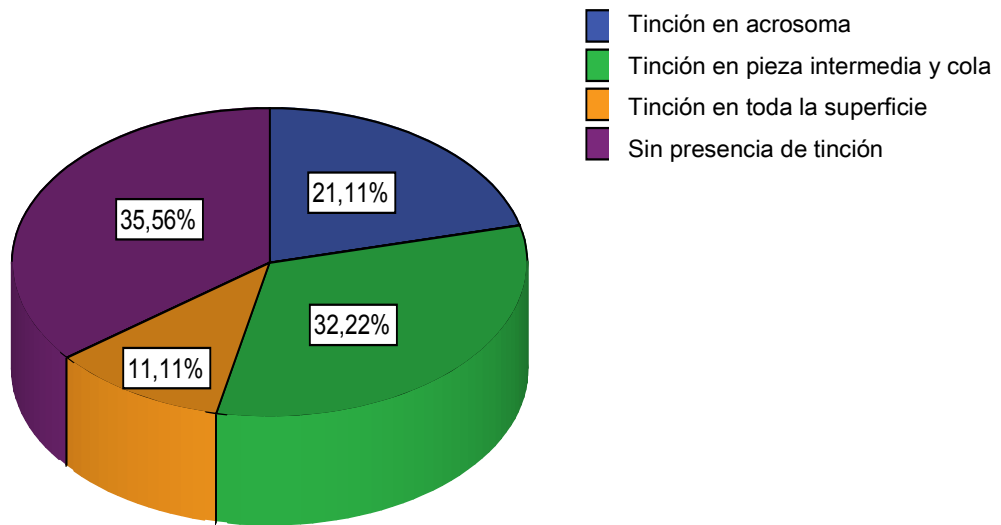




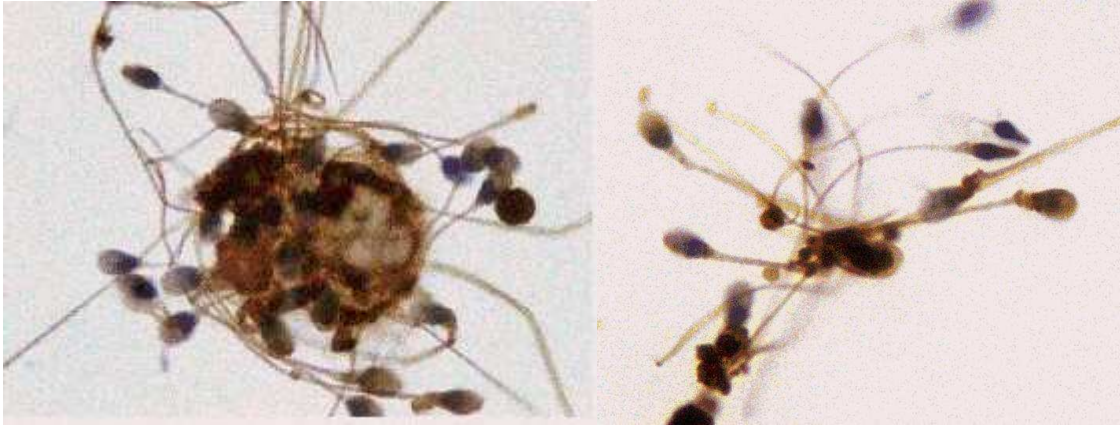
**Imagen 8.** Patrones de expresión de clusterina en espermatozoides (tonalidad marrón). a) No tinción, b) teñido en toda la superficie, c) tinción en acrosoma y algo en el pieza intermedia, d) tinción en acrosoma y parcialmente en la cola, e) tinción parcial en cola y pieza intermedia, f) pieza y cola totalmente teñida.

Si miramos el patrón de tinción más frecuente para la proteína en cada uno de los pacientes de los dos grupos, vemos que este no es la tinción definida en la cabeza, sino en la cola y la pieza intermedia del espermatozoide, seguido de la expresión localizada en el acrosoma y por último la expresión en toda la superficie de espermatozoide (Gráfica 6).

**Gráfica 6: Patrón de tinción más frecuente para la clusterina.**



También hemos encontrado la presencia de aglutinaciones de espermatozoides en los que hemos visto una alta expresión de clusterina, dándose sobretodo a nivel de la cola o en toda la superficie de los espermatozoides (Imagen 9), aunque no tuvimos forma de cuantificarlo.



**Imagen 9.** Expresión de clusterina en agregados y aglutinaciones de espermatozoides.

Para el análisis estadístico, se tuvo en cuenta el porcentaje de espermatozoides que presentaban algún tipo de tinción marrón sin determinar su localización. Se definieron otras tres categorías en función de la zona marcada: Tinción y/o expresión localizada en el acrosoma, tinción en pieza intermedia y/o cola y tinción en toda la superficie del espermatozoide, también expresadas como porcentajes.

Para interpretar si una muestra presentaba un alto nivel de expresión de clusterina o no, debido a la ausencia de un valor de referencia publicado, se tomó el valor de la mediana de todas las muestras incluyendo los dos grupos de estudio. A modo de ejemplo, para el valor de expresión de clusterina localizada en el acrosoma, se interpretó que una muestra presentaba una alta expresión para este parámetro cuando presentaba un valor igual o superior al 19% y una baja expresión si el valor dado para este porcentaje era menor de 19, el resto de valores puede observarse en la tabla 8. Los valores de expresión variaron desde el 0% para alguna de las variables hasta una alta expresión del 96%. Como se puede ver en la tabla, para la expresión de clusterina localizada en el acrosoma, el nivel de expresión varía desde una ausencia total hasta el 69%. Para la expresión localizada en cuello y pieza intermedia esta variaba entre valores del 1 al 87%, siendo el valor de la mediana del 26%. Mientras que para una tinción completa del espermatozoide los valores fueron desde el 0 al 65% y la mediana de 10%. La expresión de la proteína independientemente de la localización de la misma tuvo un valor medio de 61% y una mediana del 64%, que fue el valor tomado de referencia para el estudio estadístico. Los valores máximos y mínimos fueron 96 y 4, respectivamente. Para los espermatozoides que no presentaban expresión de la proteína, el máximo y el

mínimo tuvieron valores muy parecidos a la anterior variable, pero en este caso el valor medio fue de casi el 40% y la mediana tuvo un valor del 36,5%.

Se realizó también el estudio de expresión génica mediante qRT-PCR, al igual que para el estudio de inmunohistoquímica se tomó el resultado como una variable dicotómica para el estudio estadístico, tomando como referencia el valor de la mediana del delta-ct. De este modo, aquellas muestras en las que se obtuvo un valor menor al 11,14, se consideraron como una alta expresión y las muestras por encima de este valor se consideraron como baja expresión relativa de clusterina, ya que como se explicó en el apartado de material y método, el valor delta-ct es inversamente proporcional a la cantidad de transcrito de la muestra. Para este estudio, el valor máximo obtenido fue de 14,4 y el valor mínimo de 8,15.

**Tabla 8:** Estadísticos. Patrones de tinción para el estudio de clusterina por Inmunohistoquímica.

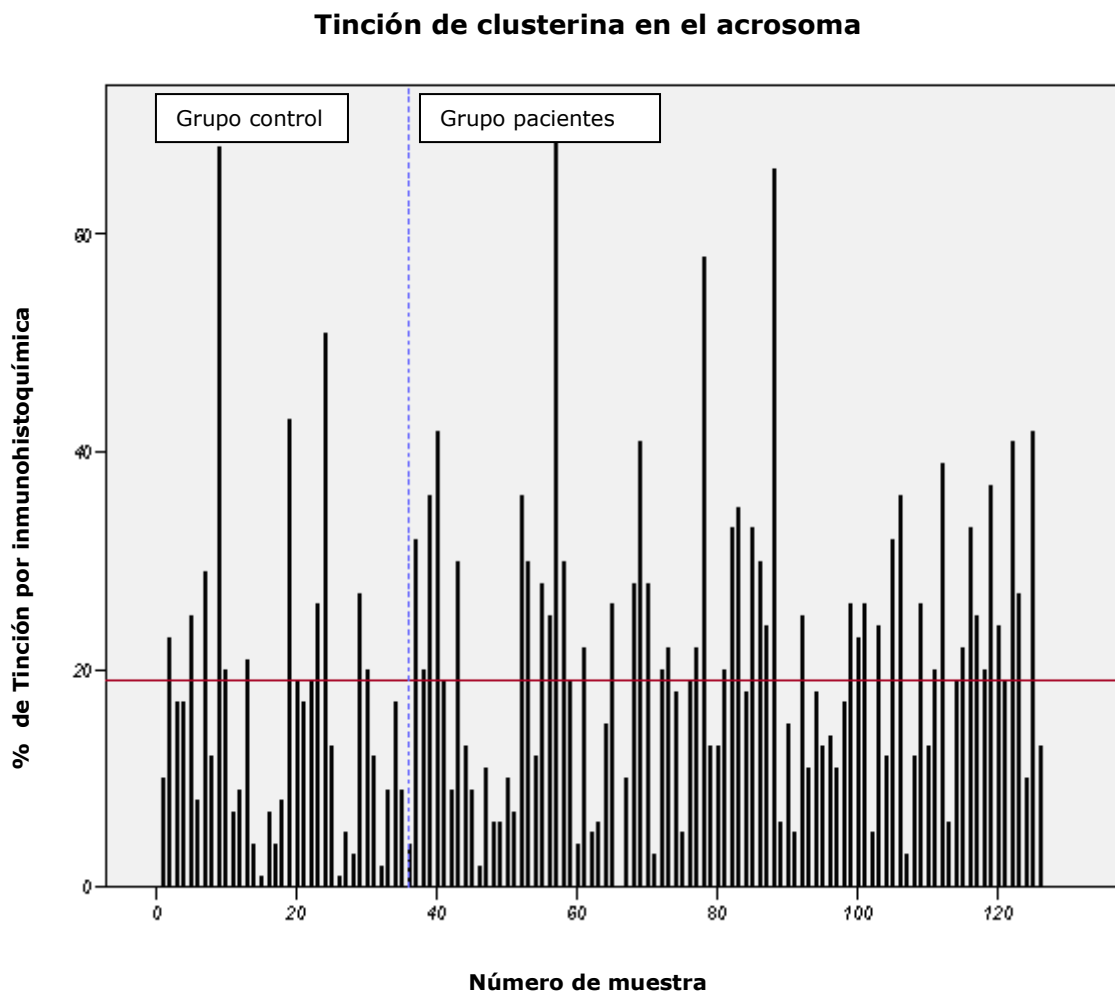
|   |             | %<br>Espermatoz.<br>que no<br>presentan<br>tinción para<br>clusterina<br>(Inmunohist) | %<br>Espermatoz.<br>que<br>presentan<br><b>tinción</b> para<br>clusterina<br>(Inmunohist) | %<br>Espermatoz.<br>con tinción<br>en<br><b>Acrosoma</b><br>(Inmunohist) | %<br>Espermatoz.<br>con tinción<br>en <b>toda su<br/>superficie</b><br>(Inmunohist) | %<br>Espermatoz.<br>con tinción<br>en <b>pieza<br/>intermedia<br/>y cola.</b><br>(Inmunohist) | Expresión<br>de<br>clusterina<br><b>qRT-PCR</b><br>(deltact) |
|---|-------------|---|---|--|---|---|--|
| N | Válidos     | 126   | 126   | 126  | 126   | 126   | 113  |
|   | Perdidos    | 0   | 0   | 0  | 0   | 0   | 13   |
|   | Media       | 39,17   | 61,11   | 19,80  | 12,85   | 28,48   | 11,2277  |
|   | Mediana     | <b>36,50</b>  | <b>64,00</b>  | <b>19,00</b>   | <b>10,00</b>  | <b>26,00</b>  | <b>11,14</b>   |
|   | Moda        | 30 (a)  | 50 (a)  | 13 (a)   | 6 (a)   | 17  | 12,19 (a)  |
|   | Desv. típ.  | 19,76   | 19,42   | 13,79  | 10,52   | 16,60   | 1,29   |
|   | Varianza    | 390,54  | 377,33  | 190,35   | 110,76  | 275,67  | 1,67   |
|   | Mínimo      | 3   | 4   | 0  | 0   | 1   | 8,15   |
|   | Máximo      | 96  | 96  | 69   | 65  | 87  | 14,44  |
|   | Percentiles |   |   |  |   |   |  |
|   | 25          | 23,00   | 46,75   | 9,00   | 6,00  | 16,75   | 10,23  |
|   | 50          | 36,50   | 64,00   | 19,00  | 10,00   | 26,00   | 11,14  |
|   | 75          | 55,00   | 77,00   | 26,25  | 17,25   | 37,00   | 12,19  |

(a) Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

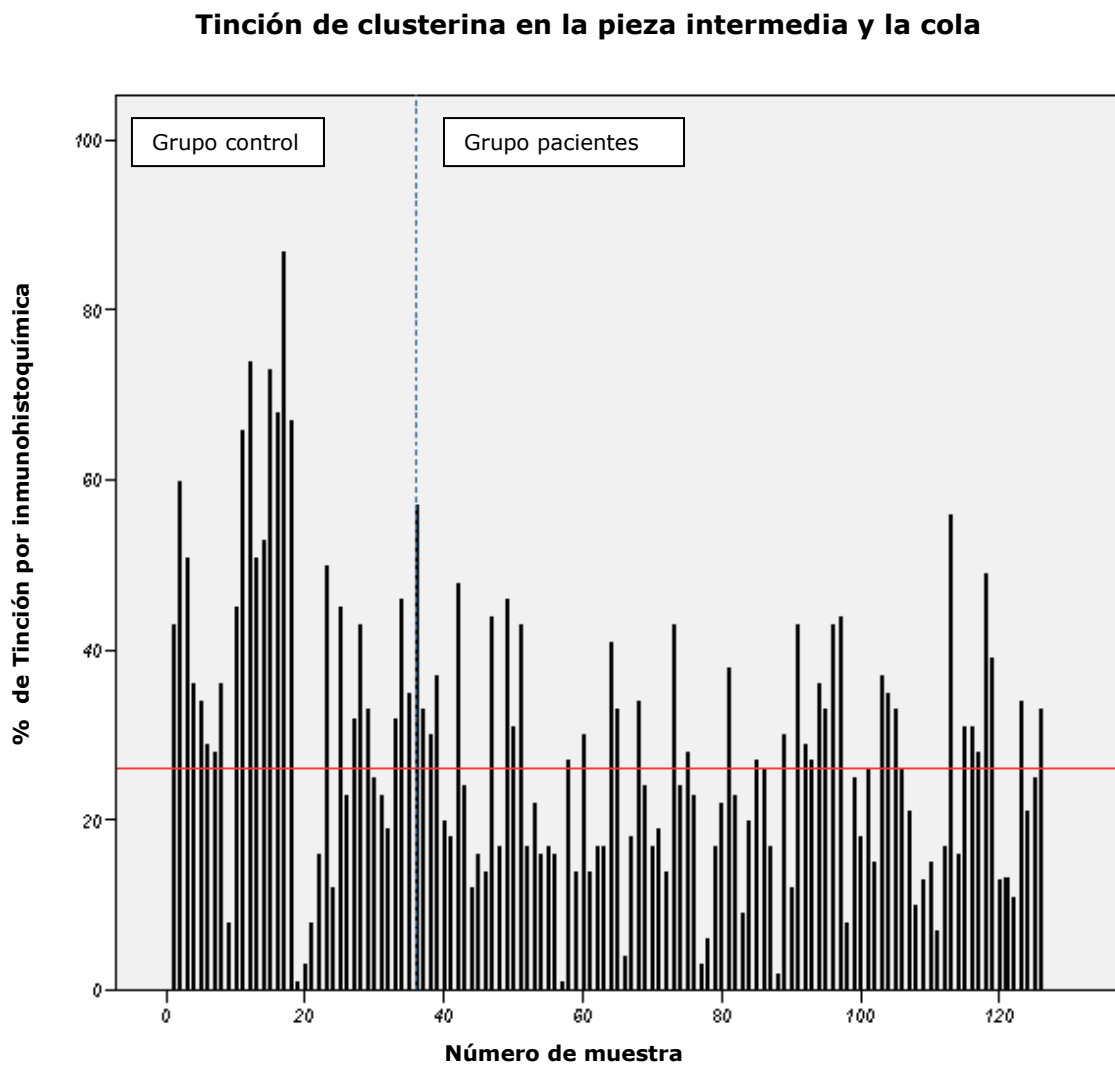
En las gráficas 7-11 que se presentan a continuación, se representan los valores de cada individuo en cada uno de los grupos de estudio para el estudio por inmunohistoquímica. Se han representado: la expresión de clusterina en el espermatozoide, es decir, porcentaje de espermatozoides que expresan clusterina sin evaluar la localización (gráfica 10), la variable porcentaje de tinción localizada en acrosoma (gráfica 7,) pieza intermedia y cola (gráfica 8) y la tinción en toda la superficie del espermatozoide (gráfica 9). Por encima de la línea que representa la mediana (línea horizontal roja), valor tomado como referencia para reconvertir las variables en dicotómicas, están las muestras con más expresión de clusterina y por

debajo de la línea están las muestras con un valor de expresión menor a la mediana de la población. En la gráfica 11, se muestra la distribución de la expresión de clusterina medida mediante la técnica de qRT-PCR, en cuya representación las muestras con valores por encima de la mediana, van a ser aquellas que presenten menor clusterina. Como hemos explicado antes, los valores de delta-ct representados son inversamente proporcionales a la cantidad de clusterina de cada muestra, por tanto, los valores que quedan por debajo de la línea de la mediana serán las muestras con más expresión. Igualmente ha sido el valor de la mediana, el tomado como referencia en el estudio estadístico para reconvertir estas variables a dicotómicas.

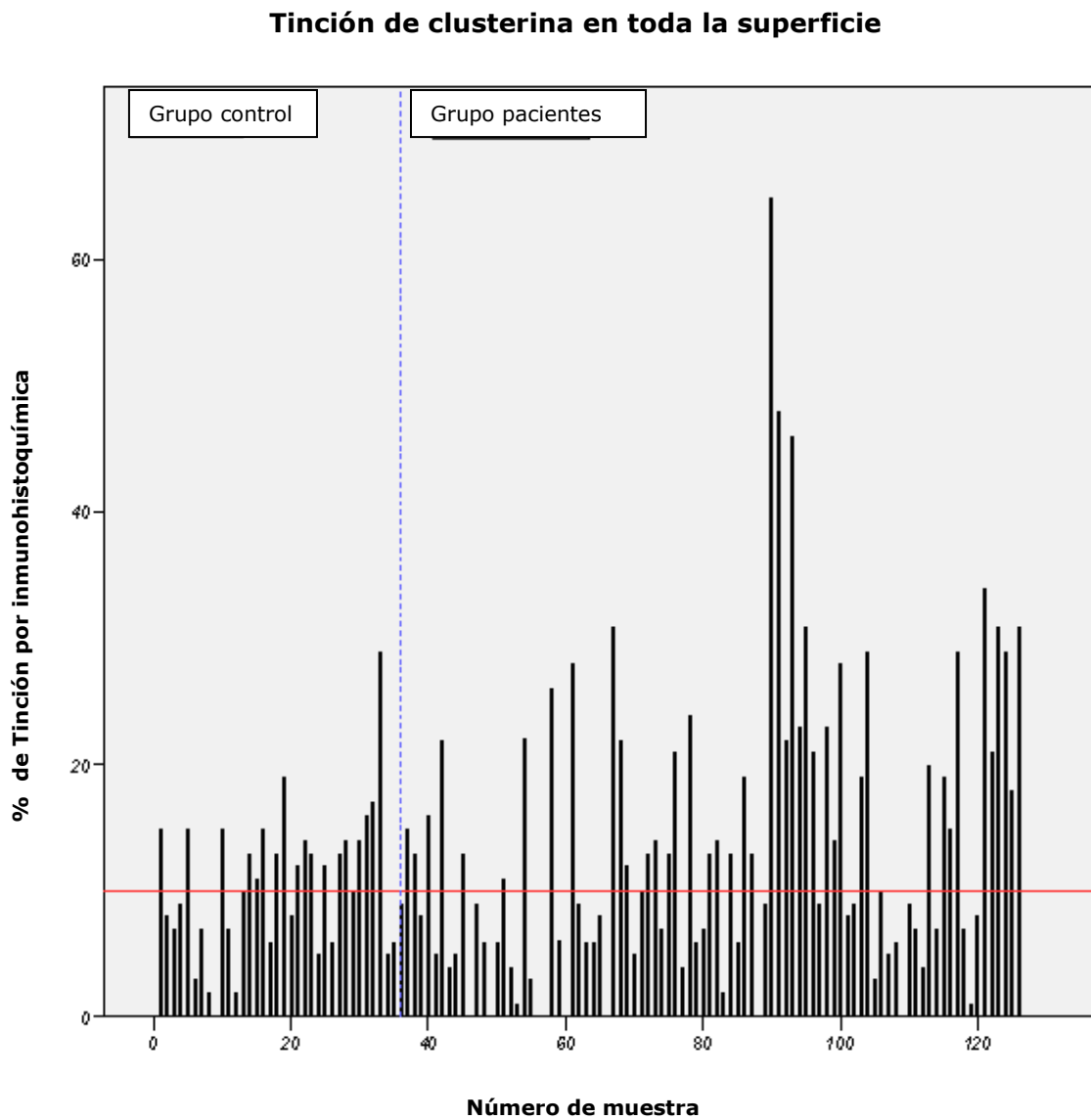
**Gráfica 7: Tinción de clusterina localizada en acrosoma del espermatozoide para toda la población de estudio (grupo control y grupo de pacientes).**



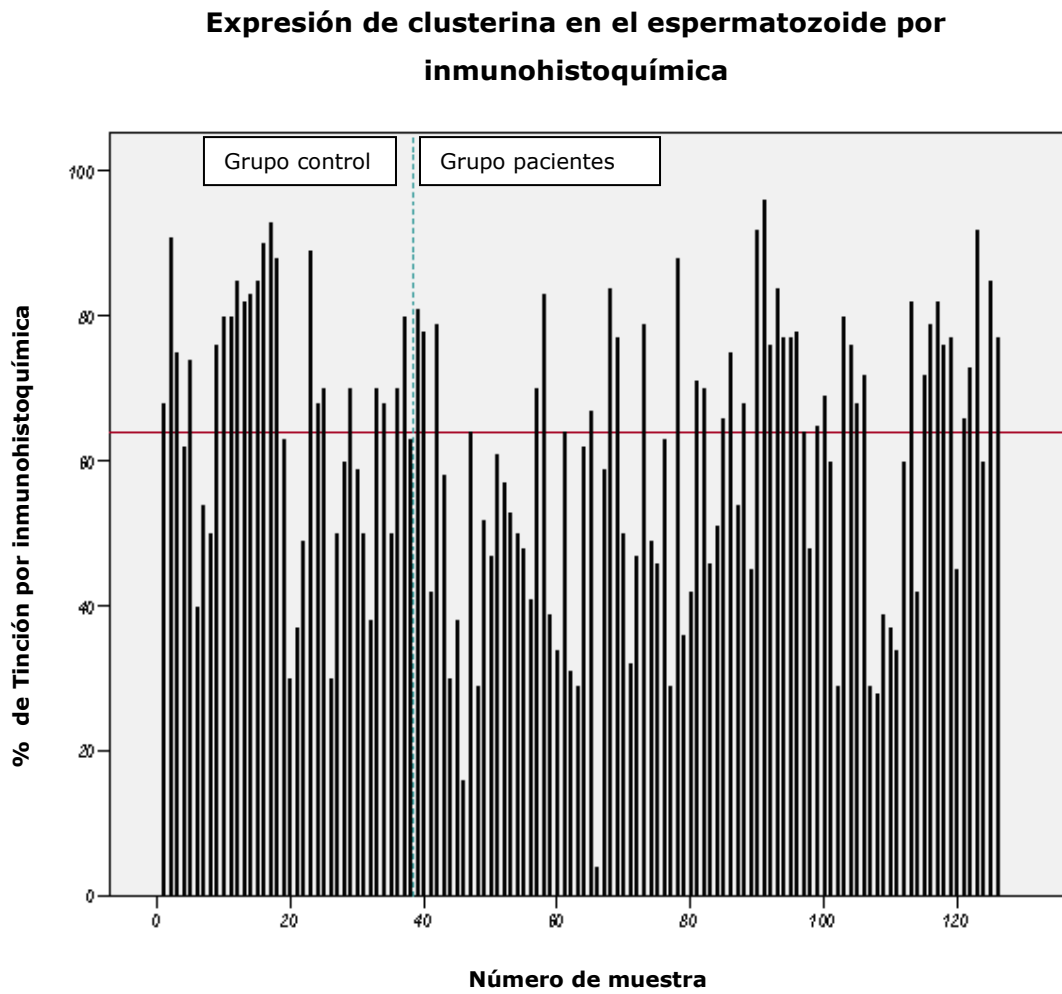
**Gráfica 8: Tinción de clusterina localizada en la pieza intermedia y cola del espermatozoide para toda la población de estudio (grupo control y grupo de pacientes).**



**Gráfica 9: Tinción de clusterina localizada en toda la superficie del espermatozoide para toda la población de estudio (grupo control y grupo de pacientes).**

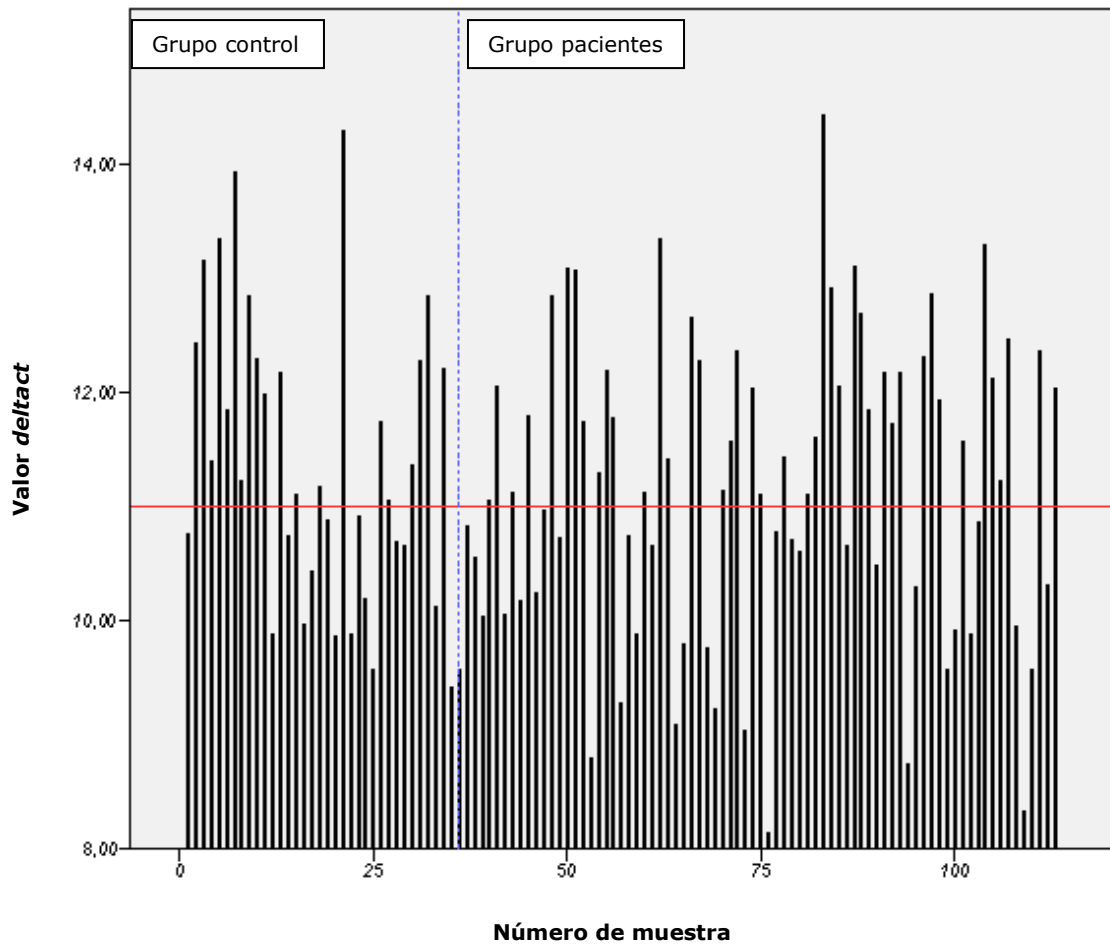


**Gráfica 10: Expresión de clusterina mediante inmunohistoquímica en el espermatozoide para toda la población de estudio (grupo control y grupo de pacientes).**



**Gráfica 11: Expresión de clusterina mediante qRT-PCR en espermatozoides para toda la población de estudio (grupo control y grupo de pacientes).**

**Expresión de clusterina en el espermatozoide mediante qRT-PCR**



#### 4. Relación entre la expresión de clusterina y las variables del seminograma. Objetivo 2.

A la luz de los resultados anteriores, nuestro siguiente objetivo en este trabajo fue ver si existía alguna relación entre las variables obtenidas tras la realización de un seminograma y la expresión de clusterina en el espermatozoide. Para la primera variable dada por el seminograma, concentración total de espermatozoides (tabla 9), hemos obtenido una tendencia a la significación para la tinción localizada en el acrosoma. Así una concentración de espermatozoides menor al valor de referencia, se asocia con un menor porcentaje de espermatozoides que expresan clusterina localizada en esta zona. Además, hemos visto que pacientes oligozoospermicos presentan significativamente un porcentaje mayor de espermatozoides que expresan clusterina en toda la superficie del espermatozoide ( $p=0,002$ ). No hemos encontrado relación para el resto de patrones de expresión, al igual que para la expresión de clusterina en el espermatozoide independientemente de la localización estudiada mediante inmunohistoquímica. Tampoco para la expresión de clusterina medida mediante qRT-PCR.

**Tabla 9.** Tabla de contingencia. Relación entre la concentración total de espermatozoides y la expresión de clusterina.

| Expresión de clusterina   | Expresión | Concentración total de espermatozoides |       | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|--|-------|---------------------------------|
|   |           | Oligozoosp.                            | Normo |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 5                                      | 57    | 0,101                           |
|   | Alta      | 11                                     | 53    |                                 |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)           | Baja      | 11                                     | 51    | 0,079                           |
|   | Alta      | 5                                      | 59    |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 2                                      | 58    | 0,002                           |
|   | Alta      | 14                                     | 52    |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 5                                      | 56    | 0,114                           |
|   | Alta      | 11                                     | 54    |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 6                                      | 51    | 0,606                           |
|   | Alta      | 6                                      | 50    |                                 |

Para la variable de movilidad espermática progresiva, obtuvimos que las muestras astenozoospermicas presentan un menor porcentaje de espermatozoides que expresan clusterina independientemente de su localización ( $p=0,033$ ). Si tenemos en cuenta la localización de la proteína, observamos diferencias significativas para la expresión en acrosoma, de este modo pacientes con movilidad alterada presentaron una menor expresión ( $p=0,033$ ). No hemos encontrado significación para el resto de patrones, tampoco para el estudio de expresión de la proteína por qRT-PCR (Tabla 10).

**Tabla 10.** Tabla de contingencia. Relación entre el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y la expresión de clusterina.

| Expresión de clusterina   | Expresión | Espermatozoides <b>móviles progresivos</b> (%) |       | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|--|-------|---------------------------------|
|   |           | Astenozoosp.                                   | Normo |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 10   | 52    | 0,033                           |
|   | Alta      | 3  | 61    |                                 |
| Tinción de clusterina en el acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)     | Baja      | 10   | 52    | 0,033                           |
|   | Alta      | 3  | 61    |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 8  | 52    | 0,221                           |
|   | Alta      | 5  | 61    |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 5  | 56    | 0,322                           |
|   | Alta      | 8  | 57    |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 5  | 52    | 0,487                           |
|   | Alta      | 6  | 50    |                                 |

Esto está en consonancia con los resultados de la variable anterior, para pacientes asteno y oligozoospermicos. Hemos encontrado una menor expresión de clusterina localizada en acrosoma. Podemos relacionar, por tanto, la baja expresión de clusterina en el acrosoma con un seminograma alterado para el valor de concentración y de movilidad.

En el estudio de morfología espermática, no hemos encontrado relación estadísticamente significativa para la expresión génica de clusterina analizada por qRT-PCR o por inmunohistoquímica. Tampoco hemos encontrado relación para los diferentes patrones de localización de la proteína (Tabla 11).

**Tabla 11.** Tabla de contingencia. Relación entre la morfología espermática y la expresión de clusterina.

| Expresión de clusterina   | Expresión | Morfología espermática (%) |       | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|----------------------------|-------|---------------------------------|
|   |           | Teratozoosp.               | Normo |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 3                          | 56    | 0,492                           |
|   | Alta      | 2                          | 58    |                                 |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)           | Baja      | 4                          | 55    | 0,108                           |
|   | Alta      | 1                          | 59    |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 2                          | 54    | 0,556                           |
|   | Alta      | 3                          | 60    |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 2                          | 55    | 0,540                           |
|   | Alta      | 3                          | 59    |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 3                          | 50    | 0,491                           |
|   | Alta      | 2                          | 52    |                                 |

## 5. Diferencias en la expresión de clusterina entre los diferentes grupos de estudio. Objetivo 3.

Para describir si existen diferencias significativas entre el grupo control de varones fértiles con seminograma normal y el grupo de pacientes que están en nuestro programa de fecundación *in vitro*, realizamos una comparación de medias para cada una de las variables definidas para la expresión de clusterina (Tabla 12). Como se muestra en la Tabla hay diferencias significativas cuando la clusterina se expresa en la zona del cuello y cola del espermatozoide y cuando ésta se expresa localizada en el acrosoma. Para la primera variable, vemos que en el grupo control aparece una alta expresión estadísticamente significativa. Por el contrario para la localización en el acrosoma la expresión es menor en el grupo control. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas para la expresión de clusterina localizada en toda la superficie del espermatozoide. Tampoco para la expresión independientemente de la localización en el espermatozoide medida por inmunohistoquímica o por qRT-PCR.

**Tabla 12.** Tabla de contingencia. Expresión de clusterina comparada para grupo control y grupo de pacientes.

| Expresión de clusterina   | Expresión | Grupo de estudio |          | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|------------------|----------|---------------------------------|
|   |           | Control          | Paciente |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 15               | 47       | 0,191                           |
|   | Alta      | 21               | 43       |                                 |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)           | Baja      | 23               | 39       | 0,029                           |
|   | Alta      | 13               | 51       |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 16               | 44       | 0,400                           |
|   | Alta      | 20               | 46       |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 10               | 51       | 0,006                           |
|   | Alta      | 26               | 39       |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 18               | 38       | 0,555                           |
|   | Alta      | 18               | 39       |                                 |

Por los resultados obtenidos, nos planteamos estudiar si existirían las mismas relaciones dividiendo el grupo de pacientes infértiles por cada una de las alteraciones en el seminograma. Así, separamos a los pacientes en subgrupos, atendiendo a la concentración espermática alterada, a la movilidad alterada, o a la morfología anormal y por último, un subgrupo formado por pacientes con seminograma normal. De este modo, el grupo de pacientes con concentración alterada englobó varones diagnosticados: O, OAT, OA, OT; el segundo grupo de pacientes con movilidad alterada estaba formado por varones: A, OA, AT, OAT; el tercer grupo de pacientes con morfología alterada, estaba formado por: T, OT, AT, OAT; y un cuarto grupo de pacientes formado por los normozoospermicos. Cada uno de estos subgrupos se comparó con el grupo control.

Al calcular el valor medio en cada subgrupo para las variables de expresión de clusterina, obtuvimos que varones con concentración espermática alterada presentaban el mayor promedio para la expresión global de clusterina calculada por qRT-PCR y por inmunohistoquímica (Tabla 13), presentando también un mayor promedio de espermatozoides con clusterina localizada en toda la superficie del mismo. El subgrupo de pacientes con morfología anormal tiene un alto valor medio de espermatozoides que expresan clusterina en toda la superficie del espermatozoide, similar al grupo anterior. Varones con movilidad alterada presenta valores medios para todas las variables. Es sorprendente el alto porcentaje de expresión en el acrosoma para el subgrupo de pacientes normozoospermicos pero infértiles. Por último, el grupo de controles se mantiene con valores medios para las variables de expresión proteica, presentando el valor más elevado en la expresión intermedia localizada en el cuello y cola.

**Tabla 13.** Valores medios de expresión de clusterina por subgrupos de pacientes infértiles y grupo de controles.

|                                      |              | % Espermatoz. que presentan tinción para clusterina. (Inmunohist) | % Espermatoz. con tinción en acrosoma (Inmunohist) | % Espermatoz. con tinción en toda su superficie (Inmunohist) | % Espermatoz. con tinción en pieza intermedia y cola. (Inmunohist) | Expresión de clusterina qRT-PCR (deltact) |
|--------------------------------------|--------------|---|--|--|--|---|
| <b>GRUPO DE PACIENTES INFÉRTILES</b> | OLIGOZOOSP.  | 74  | 16   | 27   | 32   | 10,83                                     |
|                                      | ASTENOZOOSP. | 56  | 17   | 11   | 28   | 11,35                                     |
|                                      | TERATOZOOSP. | 65  | 11   | 28   | 27   | 11,84                                     |
|                                      | NORMOZOOSP.  | 57  | 23   | 12   | 22   | 11,18                                     |
| <b>GRUPO DE CONTROLES FÉRTILES</b>   |              | 66  | 16   | 11   | 39   | 11,35                                     |

Al realizar el estudio estadístico, tomando como referencia el valor de la mediana para evaluar una alta o baja expresión de la clusterina, los resultados estadísticos muestran que el grupo de pacientes con concentración alterada (O, OA, OT, OAT) presentan una proporción de espermatozoides con expresión de clusterina en toda su superficie mayor que el grupo control,  $p= 0,024$  (Tabla 14). En la comparativa entre grupo control y pacientes con la movilidad espermática alterada (A, OA, AT, OAT), hemos obtenido una relación estadística para la expresión global de clusterina en el espermatozoide mediante inmunohistoquímica (Tabla 15). En este caso el grupo astenozoospermico presenta menor expresión que el grupo control ( $p=0,033$ ). No obtuvimos ninguna relación estadística entre pacientes con morfología anormal (T, OT, AT, OAT) y el grupo control (Tabla 16), aunque este grupo presentara un alto valor medio de espermatozoides que expresan clusterina en toda la superficie, como se puede observar en la Tabla 13.

**Tabla 14.** Tabla de contingencia. Expresión de clusterina comparada para grupo control y grupo de pacientes con concentración espermática alterada.

| Expresión de clusterina   | Expresión | Grupos de estudio     |           | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|-----------------------|-----------|---------------------------------|
|   |           | Pacientes oligozoosp. | Controles |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 5                     | 15        | 0,347                           |
|   | Alta      | 11                    | 21        |                                 |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)           | Baja      | 11                    | 23        | 0,496                           |
|   | Alta      | 5                     | 13        |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 2                     | 16        | 0,024                           |
|   | Alta      | 14                    | 20        |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 5                     | 10        | 0,523                           |
|   | Alta      | 11                    | 26        |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 6                     | 18        | 0,630                           |
|   | Alta      | 6                     | 18        |                                 |

**Tabla 15.** Tabla de contingencia. Expresión de clusterina comparada para grupo control y grupo de pacientes con movilidad espermática alterada.

| Expresión de Clusterina   | Expresión | Grupos de estudio      |           | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|------------------------|-----------|---------------------------------|
|   |           | Pacientes astenozoosp. | Controles |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 13                     | 15        | 0,033                           |
|   | Alta      | 5                      | 21        |                                 |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)           | Baja      | 12                     | 23        | 0,544                           |
|   | Alta      | 6                      | 13        |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 12                     | 16        | 0,105                           |
|   | Alta      | 6                      | 20        |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 8                      | 10        | 0,179                           |
|   | Alta      | 10                     | 26        |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 9                      | 18        | 0,367                           |
|   | Alta      | 6                      | 18        |                                 |

**Tabla 16.** Tabla de contingencia. Expresión de clusterina comparada para grupo control y grupo de pacientes con morfología espermática alterada.

| Expresión de clusterina   | Expresión | Grupos de estudio      |           | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|------------------------|-----------|---------------------------------|
|   |           | Pacientes teratozoosp. | Controles |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 3                      | 15        | 0,381                           |
|   | Alta      | 2                      | 21        |                                 |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)           | Baja      | 4                      | 23        | 0,436                           |
|   | Alta      | 1                      | 13        |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 2                      | 16        | 0,619                           |
|   | Alta      | 3                      | 20        |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 2                      | 10        | 0,461                           |
|   | Alta      | 3                      | 26        |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 3                      | 18        | 0,524                           |
|   | Alta      | 2                      | 18        |                                 |

Al comparar el grupo de pacientes normozoospermicos con el grupo control fértil, hemos encontrado que este grupo de pacientes pertenecientes a nuestro programa de fecundación *in vitro*, y con un seminograma normal, presenta mayor expresión de clusterina localizada en el acrosoma con respecto al grupo control ( $p=0,006$ ). Para la expresión de la proteína localizada en el cuello y cola del espermatozoide, el resultado fue al contrario, en la muestra de pacientes hubo una expresión menor con respecto al grupo control con una  $p=0,001$  (Tabla 17).

**Tabla 17.** Tabla de contingencia. Expresión de clusterina comparada para grupo control y grupo de pacientes normozoospermicos.

| Expresión de clusterina   | Expresión | Grupos de estudio     |           | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|-----------------------|-----------|---------------------------------|
|   |           | Pacientes normozoosp. | Controles |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 32                    | 15        | 0,230                           |
|   | Alta      | 30                    | 21        |                                 |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)           | Baja      | 22                    | 23        | 0,006                           |
|   | Alta      | 40                    | 13        |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 31                    | 16        | 0,375                           |
|   | Alta      | 31                    | 20        |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 40                    | 10        | 0,001                           |
|   | Alta      | 22                    | 26        |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 27                    | 18        | 0,585                           |
|   | Alta      | 27                    | 18        |                                 |

## 6. Relación de la expresión de clusterina y los resultados de un tratamiento de fecundación *in vitro*. Objetivo 4.

Como último objetivo para este trabajo, nos propusimos ver la relación de la expresión de clusterina con los resultados obtenidos tras un tratamiento de fecundación *in vitro*. Para ello, tuvimos en cuenta sólo a nuestro grupo de pacientes y como variables para reflejar el éxito del tratamiento utilizamos: el porcentaje de fecundación de los óvulos inseminados, la calidad embrionaria de aquellos que fueron seleccionados para transferírseles a la pareja de nuestros pacientes en la primera transferencia en fresco durante la realización del tratamiento, y por último, el test de gestación realizado a los 14 días post-transferencia.

Para el porcentaje de fecundación, definimos como valor de referencia el estándar de calidad dado por la Sociedad Española de Fertilidad (Moreno et al., 2012). Así hablaremos de un valor subóptimo, cuando este esté por debajo de este valor y, cuando esté por encima, de un porcentaje óptimo. Al comparar esta variable con la expresión de clusterina en el espermatozoide, no obtuvimos diferencias significativas como se muestra en siguiente Tabla:

**Tabla 18.** Tabla de contingencia. Relación entre el porcentaje de fecundación obtenido tras un tratamiento de F.I.V y la expresión de clusterina.

| Expresión de clusterina   | Expresión | Porcentaje de fecundación |        | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|---------------------------|--------|---------------------------------|
|   |           | Sub-óptima                | Óptima |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 23                        | 22     | 0,256                           |
|   | Alta      | 18                        | 25     |                                 |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)           | Baja      | 15                        | 24     | 0,125                           |
|   | Alta      | 26                        | 23     |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 25                        | 24     | 0,237                           |
|   | Alta      | 16                        | 23     |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 21                        | 21     | 0,345                           |
|   | Alta      | 20                        | 26     |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 15                        | 22     | 0,277                           |
|   | Alta      | 19                        | 19     |                                 |

Al estudiar la siguiente variable, la calidad de los embriones transferidos durante un tratamiento de fecundación *in vitro*, se tomaron dos categorías, como ya se explicó en el apartado de material y métodos. En una, los embriones transferidos (uno o dos) eran de buena calidad (tipo A y/o B, según la clasificación Asebir) y en otra, los embriones transferidos eran de cualquier otra calidad. No obtuvimos relación estadísticamente significativa para esta variable y la expresión de clusterina en los espermatozoides de los varones sometidos al tratamiento, estudiada tanto por inmunohistoquímica como por qRT-PCR.

**Tabla 19.** Tabla de contingencia. Relación entre la calidad de los embriones transferidos en un tratamiento de F.I.V. y la expresión de clusterina.

| Expresión de clusterina   | Expresión | Calidad de los embriones transferidos  |                                | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|--|--------------------------------|---------------------------------|
|   |           | Embriones transferidos de otra calidad | Embriones transferidos A y/o B |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 24                                     | 15                             | 0,375                           |
|   | Alta      | 27                                     | 13                             |                                 |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)           | Baja      | 21                                     | 13                             | 0,415                           |
|   | Alta      | 30                                     | 15                             |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 26                                     | 17                             | 0,277                           |
|   | Alta      | 25                                     | 11                             |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 26                                     | 11                             | 0,224                           |
|   | Alta      | 25                                     | 17                             |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 19                                     | 15                             | 0,205                           |
|   | Alta      | 22                                     | 10                             |                                 |

Por último, al relacionar el resultado del test de gestación realizado tras el tratamiento F.I.V con la expresión de nuestra proteína, obtuvimos que una alta expresión de clusterina localizada en el acrosoma está relacionada con un test de gestación negativo, por lo que se relaciona también con un fracaso del tratamiento,  $p=0,012$  (Tabla 20). Para el estudio de expresión génica mediante el uso de la técnica qRT-PCR, una mayor expresión de clusterina en el espermatozoide está relacionado con un test de gestación negativo,  $p=0,041$ . Para el resto de variables establecidas en el estudio de expresión proteica no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas. Por lo que podemos concluir que una alta expresión génica de clusterina y/o la localización en el acrosoma predeterminan fracaso en un

tratamiento de fecundación *in vitro*.

**Tabla 20.** Tabla de contingencia. Relación entre el test de gestación obtenido tras el tratamiento de F.I.V. y la expresión de clusterina.

| Expresión de clusterina   | Expresión | Test de gestación |          | Nivel de signific. (unilateral) |
|---|-----------|-------------------|----------|---------------------------------|
|   |           | Negativo          | Positivo |                                 |
| Espermatozoides que expresan tinción para clusterina. (Inmunohistoquímica)        | Baja      | 23                | 15       | 0,685                           |
|   | Alta      | 27                | 13       |                                 |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)           | Baja      | 16                | 18       | 0,012                           |
|   | Alta      | 34                | 10       |                                 |
| Tinción clusterina en toda la superficie del espermatozoide. (Inmunohistoquímica) | Baja      | 26                | 16       | 0,841                           |
|   | Alta      | 24                | 12       |                                 |
| Tinción de clusterina cuello y cola del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)      | Baja      | 21                | 15       | 0,455                           |
|   | Alta      | 29                | 13       |                                 |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR                          | Baja      | 17                | 15       | 0,041                           |
|   | Alta      | 26                | 8        |                                 |

Finalmente se realizó el análisis de regresión logística multivariante tomando como variable dependiente el resultado del test de gestación positivo, que confirmaron los resultados anteriores. Así un test de gestación positivo se relaciona con una baja expresión de clusterina en el acrosoma con un OR de 14,8 siendo el intervalo de confianza (IC) al 95% entre 2,78 y 79,3. Igualmente, el éxito del tratamiento se relaciona con baja expresión de clusterina medido por qRT-PCR con un OR de 10,85, para el cual el IC está entre los valores 2,05 y 57,43.

**Tabla 21:** Análisis de regresión logística multivariante, variable dependiente: Test de gestación positivo.

|  | B     | Sig. (p) | Odds Ratio | I.C. 95,0% para EXP(B) |          |
|--|-------|----------|------------|------------------------|----------|
|  |       |          |            | Inferior               | Superior |
| Tinción de clusterina acrosoma del espermatozoide. (Inmunohistoquímica)* | 2,698 | 0,002    | 14,847     | 2,780                  | 79,305   |
| Expresión de clusterina en el espermatozoide por qRT-PCR*                | 2,384 | 0,005    | 10,851     | 2,050                  | 57,432   |

\* Referencia de las variables independientes dicotómicas: baja expresión.

## DISCUSIÓN



## 1. Localización y expresión de clusterina en el espermatozoide.

Después de los resultados obtenidos, podemos afirmar la presencia de clusterina en el espermatozoide. Además presenta una localización variable que puede distribuirse por toda la superficie del espermatozoide, en la zona del acrosoma o con una distribución intermedia en cola y cuello, tal y como hemos demostrado mediante inmunohistoquímica y en consonancia con lo publicado por diferentes grupos (Sylvester et al., 1991; O´Bryan et al., 1994; Jones y Jomary, 2002).

Durante la espermatogénesis, en un primer momento, la clusterina secretada por las células de Sertoli y por el epidídimo, se une al espermatozoide inmaduro en toda la superficie. Se creía que posteriormente, mientras se concluía el proceso de maduración, la proteína iba cambiando su localización y ya, en el espermatozoide maduro se localizaba en la zona del acrosoma.

Recientemente y durante el desarrollo de este estudio, el grupo de Han (2012) ha descrito que cuando el espermatozoide completa su madurez, comienza a sintetizar una proteína propia, secretada y localizada en el acrosoma, concretamente, en la región post-acrosomal del espermatozoide normal y que forma parte del *pool* de proteínas que es capaz de sintetizar el propio espermatozoide, a través del complejo ribosomal de sus mitocondrias, una vez que ha alcanzado su madurez. Concepto que hemos revalidado con nuestros resultados obtenidos por qRT-PCR, donde también hemos obtenido una expresión de clusterina por el propio espermatozoide variable.

De este modo, la expresión de clusterina en toda la superficie del espermatozoide representa a los espermatozoides inmaduros. Por el contrario, la expresión localizada en el acrosoma debería pertenecer a la proteína secretada, sintetizada por el propio espermatozoide maduro. Esta localización se relaciona con el proceso molecular de la reacción acrosómica y en último término, con la fertilización de un óvulo (Atlas-White et al., 2000). Tal vez entonces, cuando la expresión de la proteína está en la zona intermedia o en la cola, podría pertenecer a estadios intermedios de madurez.

Incluir el estudio de expresión génica mediante qRT-PCR nos ha ayudado a

estudiar la proteína sintetizada únicamente por el espermatozoide. Los patrones de expresión encontrados en el espermatozoide por inmunohistoquímica nos demuestran la presencia de una proteína citoplasmática y de secreción, procedente de las células de Sertoli y/o del epidídimo en el espermatozoide inmaduro, o sintetizada por él cuando llega a su madurez. Mediante la técnica de qRT-PCR, hemos obtenido expresión de clusterina sintetizada por el propio espermatozoide.

No hemos encontrado tinción localizada en el núcleo de la célula, que correspondería a la isoforma nuclear (nCLU), en ninguna de las muestras, esto hace que casi la totalidad de la proteína expresada por el espermatozoide sea la forma secretada. Hay trabajos donde se ha descrito que no existe expresión de esta última isoforma en el espermatozoide normal de muestras de varones fértiles (Han et al., 2012). Aunque en diferentes situaciones patológicas, como el Alzheimer (Calero et al., 2005; Wu et al., 2012) o distintos tipos de cáncer (Xie et al., 2002; Califice et al., 2004; Kang et al., 2004; Cao et al., 2005; Redondo et al., 2006, 2007 y 2009; Aigelsreiter et al., 2009), se produce una sobre-expresión de la isoforma nuclear en diferentes tipos de células, el único estudio que menciona la existencia de expresión en el espermatozoide, entendiendo cómo situación patológica la infertilidad, es el publicado por Thacker et al. (2011), que comparó el perfil proteico entre el esperma de hombres fértiles e infértiles utilizando electroforesis en gel y espectrometría de masas MALDI-TOF. Evaluó cuatro proteínas en cuatro pacientes, siendo sólo un paciente oligoastenozoospermico y los otros tres normales, encontrando en el primero mayor expresión de isoforma nuclear de la clusterina.

Es clave el estudio de la localización de la clusterina en el espermatozoide para entender su papel en la fertilidad masculina. Aunque *a priori* la localización de clusterina es un indicador de un buen ensamblaje del acrosoma (O´Bryan et al., 1994) y de una morfología normal (Han et al., 2012), aumento en el porcentaje de espermatozoides que expresan clusterina en toda su superficie dentro de un eyaculado podría representar una defectuosa espermatogénesis y sería un marcador de alteraciones en el seminograma. Esto estaría favoreciendo la adhesión espermática y, por tanto, limitando su movilidad.

Es posible que la función de adhesión de la clusterina en el espermatozoide sea más dominante que su función de supervivencia o su papel en el proceso de fecundación. Esta afirmación se apoya en la alta presencia de clusterina detectada en los agregados y aglutinados de espermatozoides, en los que se observan

numerosos espermatozoides positivos en toda su superficie para la proteína, tal y como se observa en la Imagen 9. Ya sabemos que esos agregados están formados en su mayoría por espermatozoides defectuosos (Carlsson et al., 2004) y morfológicamente anormales (Ibrahim et al., 2000). Al estar insertados en estos agregados, no serán espermatozoides que lleguen a fecundar un óvulo. En esta situación, la función agregante de la clusterina secretada tiene un papel fundamental, pudiendo actuar además como un marcador inicial de apoptosis celular para estos espermatozoides no aptos para la fertilidad.

## **2. Relación entre la expresión de clusterina y las variables del seminograma.**

Al realizar el estudio comparativo de la expresión de clusterina con las variables dadas por el seminograma (concentración, movilidad y morfología) en pacientes con una concentración espermática alterada, encontramos un elevado nivel de expresión de clusterina expresada en toda la superficie del espermatozoide, de acuerdo con lo publicado en 1994 por el grupo de O´Bryan, siendo en su mayoría espermatozoides que aún no han finalizado su proceso madurativo. Hemos encontrado además una tendencia a la significación para la expresión en acrosoma, viendo que hay una menor expresión en pacientes oligozoospermicos para esta localización. No hemos encontrado diferencias estadísticas para la expresión de clusterina mediante RT-PCR, aunque el valor medio para estos pacientes sea el que representa una expresión mayor (Tabla 13).

Para el grupo de pacientes astenozoospermicos, el nivel de expresión de la proteína es generalmente menor. Evaluando los patrones de expresión que hemos obtenido para la localización de la proteína mediante inmunohistoquímica, en este grupo hay menor expresión significativa en la posición acrosómica.

Para pacientes con alteración en la morfología, el promedio de espermatozoides que tienen clusterina en toda su superficie presenta valores altos y similares a los pacientes oligozoospermicos (Tabla 13), demostrando esta tendencia el aumento de esta expresión en seminogramas alterados. Sin embargo, el análisis estadístico no demostró diferencias respecto al grupo normal para esta variable del seminograma. Tampoco obtuvimos ninguna diferencia estadística para el resto de variables de expresión proteica. Estos resultados podrían ser debidos a que este grupo de pacientes era el más reducido del estudio (5 pacientes).

En general, no hemos obtenido evidencia estadística para la expresión global de la proteína sin evaluar en qué zona del espermatozoide se expresa, ni por el estudio mediante inmunohistoquímica, ni por el estudio de expresión génica por qRT-PCR entre varones normales y aquellos que presentaban alguna alteración en su seminograma. Aún así, como vemos en la Tabla 13, el grupo de pacientes que presenta una mayor expresión de clusterina medida por qRT-PCR es el de varones con alteración en la concentración espermática. Se puede sugerir que medir la

expresión de clusterina global en espermatozoide, sin diferenciar su localización en la célula para estudiar la relación entre la expresión de clusterina y las variables del seminograma con técnicas de inmunohistoquímica o por qRT-PCR, no resulta concluyente, si no se tiene en cuenta además dónde se está expresando. Es decir, es necesario tener en cuenta la localización de la clusterina en el espermatozoide.

Nuestro estudio afirma que muestras astenozoospermicas y oligozoospermicas presentan una menor expresión de clusterina en el acrosoma. Además en pacientes oligozoospermicos existe una mayor proporción de espermatozoides que presentan la proteína en toda su superficie en comparación a muestras normales. De este modo, una menor expresión de clusterina localizada en el acrosoma está relacionada con una alteración en el seminograma para la concentración y la movilidad espermática (Tablas 9 y 10). Mientras que aumentos en la expresión de clusterina en toda la superficie del espermatozoide se relaciona con un seminograma alterado para la concentración espermática, según nuestros resultados (Tabla 9).

Que existiese una expresión de clusterina diferente en muestra de esperma alterada se describió ya en el año 2000, aunque en modelos animales. Ibrahim presentó un estudio mediante citometría de flujo en espermatozoides de toro, donde una marcación positiva para clusterina se correlacionaba inversamente con la movilidad espermática y la morfología (Ibrahim et al., 2000). En un estudio posterior, realizado sobre espermatozoides de carnero, se concluyó que en espermatozoides anormales por espermatogénesis defectuosa en aislamiento escrotal, se producía un aumento de presencia de clusterina que podría ser un marcador de un eyaculado pobre. Aunque en ninguno de los estudios se tuvo en cuenta la localización de la proteína, solo la presencia de la misma (Ibrahim et al., 2001).

En humanos se han realizado diferentes estudios sobre la expresión de clusterina. Así el grupo de Martínez-Heredia en 2008 realizó un interesante trabajo, con el fin de encontrar marcadores de expresión proteica en varones, teóricamente infértiles, que presentaban un seminograma alterado. En concreto, comparó varones normales para el seminograma (donantes de semen), con pacientes con una astenozoospermia diagnosticada. Realizó un estudio de 101 proteínas relacionadas con alguna función del espermatozoide, como la espermatogénesis, el movimiento e, incluso, el proceso de fecundación en su unión al óvulo. Este estudio se realizó mediante espectrometría de masas, y de acuerdo con los resultados del

análisis, de todas las proteínas en estudio, se agruparon a 17 como aquellas que bien aumentaban o disminuían su expresión. Al comparar el grupo de donantes con el de pacientes con movilidad espermática alterada, concluyeron que existe una diferente expresión proteica para varones infértiles. Para el caso de la proteína clusterina, detectaron un aumento de expresión en pacientes con seminograma alterado.

Si tenemos en cuenta la localización de la expresión de la proteína, los anteriores resultados no se corresponden totalmente con los nuestros. Nosotros hemos obtenido una menor expresión de clusterina en acrosoma en pacientes asteno y oligozoospermicos, posiblemente porque esta localización está relacionada con mejores parámetros seminales. Al obtener además, un aumento en espermatozoides que expresan la proteína a lo largo de toda su longitud, en el caso de pacientes oligozoospermicos, parece que es clave la localización de la proteína.

Zalata et al. (2012) realizó un estudio en paralelo al nuestro con 124 hombres, de los cuales 26 eran normozoospermicos y el resto fueron bien asteno (A), teratoasteno (TA) u oligoteratoastenozoospermicos (OAT). Encontraron que la expresión de clusterina fue significativamente mayor en las muestras de semen de hombres con un seminograma alterado. El estudio fue realizado usando un análisis de expresión génica por qRT-PCR, encontrándose la mayor expresión en pacientes OAT, después en pacientes TA y por último, en pacientes A.

Este resultado se correlaciona en parte con los valores obtenidos por nosotros, como se expresa en la Tabla 13. El valor mayor de expresión de clusterina, medido por qRT-PCR, es el del grupo de pacientes con concentración alterada, en nuestro caso hemos englobado a pacientes O, OA, OT y OAT. Aunque no hemos tenido evidencias estadísticas para definir una expresión diferencial entre varones con alteración en la concentración, la movilidad y la morfología para el seminograma.

Este grupo además describió una correlación positiva entre la morfología alterada y un aumento en la fragmentación del ADN en el espermatozoide y propone que tal vez un aumento en la expresión de clusterina podría ser un marcador seminal de estrés oxidativo. Esta propuesta ha sido también apoyada por Strocchi et al. (2006), en cuyo trabajo se describe que durante el cambio fisiológico producido frente a una situación de estrés se produce un aumento en la expresión de clusterina, clave para el mantenimiento de la viabilidad celular en su función de

citoprotección y de remodelación tisular (Leskov et al., 2003). También se ha visto que durante una situación de choque térmico se produce un aumento de su expresión (Viard et al., 1999), actuando la forma secretora como una chaperona para la eliminación de proteínas defectuosas producidas en situaciones de estrés celular.

Generalmente, clusterina está relacionada con la prevención de la precipitación de proteínas, la aglutinación de los espermatozoides y el control de la lisis inducida por el complemento de espermatozoides anormales. La clusterina es capaz de proteger a la célula de la apoptosis inducida por ROS (radicales de estrés oxidativo) por su propiedad antioxidante. Cuando las mitocondrias del espermatozoide producen un exceso de éstos radicales, se produce rápidamente un daño oxidativo relacionado con una disminución de la actividad enzimática de la acrosina por la peroxidación de la membrana plasmática. En esta situación como sabemos, además, aumenta el grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides, reduciendo su capacidad fecundante. En esta situación se ha descrito un aumento de expresión de clusterina (Sharma et al., 2013).

Aunque se ha publicado que un aumento en la expresión global de clusterina está relacionado con un seminograma alterado (Ibrahim et al., 2001; Martínez-Heredia et al., 2008; Zalata et al., 2012), lo cierto es que en nuestros resultados no hemos obtenido diferencias significativas al medir la expresión de clusterina por inmunohistoquímica (sin evaluar la localización en la célula) o medida mediante qRT-PCR. Pero, si tenemos en cuenta la zona donde se expresa la clusterina, observamos un aumento de la expresión de la misma cuando se localiza en toda la superficie del espermatozoide en pacientes oligozoospermicos y una reducción de la expresión en la zona del acrosoma también en estos pacientes y en astenozoospermicos.

Por lo que es interesante estudiar el tipo de isoforma y la localización donde se expresa la clusterina. Aunque puede que *a priori* un aumento en la expresión global de clusterina está relacionado con un seminograma alterado, parece ser que en cuanto a la localización, la expresión de la proteína en toda la superficie del espermatozoide está relacionada con un seminograma alterado, mientras que la localización en el acrosoma se relaciona con muestras de espermatozoides normales.

### **3. Diferencias en la expresión de clusterina entre los diferentes grupos de estudio.**

Seguidamente, nos planteamos que tal vez existiera una expresión diferente para la clusterina entre el grupo control-fértil y el grupo de pacientes sometidos a tratamientos de reproducción, aunque entre ellos hubiera pacientes con un seminograma normal. Observamos la expresión de clusterina para todos los varones de cada uno de los grupos, pero al comparar los grupos obtuvimos una menor expresión de clusterina en el acrosoma para el grupo de control.

Uno de los objetivos finales de este estudio ha sido que el estudio de expresión de clusterina fuera un potencial marcador de fertilidad masculina, incluso para varones que teniendo un seminograma normal no consiguen descendencia. Por ello separamos en el estudio estadístico, el grupo de pacientes en base a las patologías o la normalidad según el resultado del seminograma. Se compararon todos los subgrupos de pacientes, incluido el de normozoospermicos, con el grupo control, observándose que pacientes con alteración en la concentración espermática presentan una mayor proporción de espermatozoides que expresan clusterina en toda la superficie del espermatozoide que el grupo fértil, mientras que varones con una movilidad alterada presentan, en general, menor expresión de clusterina que los controles en el estudio por inmunohistoquímica. No hemos obtenido diferencias para el subgrupo con morfología alterada al compararlo con varones fértiles, aunque se trata del grupo más reducido de pacientes del estudio. Y finalmente, para el subgrupo de pacientes infértiles pero normales para el seminograma, obtuvimos un resultado muy interesante, al presentar una mayor expresión en el acrosoma que el grupo control. Teniendo en cuenta esto y los resultados obtenidos hasta el momento, aunque *a priori* la expresión de clusterina en acrosoma, está relacionada con una buena estructura del mismo y se encuentra disminuida su expresión en muestras oligo y astenozoospermica, por la proporción de espermatozoides anómalos que hay en estas muestras. Una expresión muy elevada en esa zona tampoco beneficia al espermatozoide, siendo posible que bajo esta circunstancia se favorezca más su función de adhesión celular e impidiendo su función normal para una buena reacción acrosómica.

Que exista una expresión génica distinta entre varones fértiles e infértiles se lleva estudiando desde principios del 2000. Uno de los primeros trabajos en los que se comparó la expresión proteica del espermatozoide entre pacientes con

intento fallido de F.I.V y controles fértiles, fue realizado en 2004 por el grupo de Pixton. En dicho trabajo, las muestra seminales de un paciente y tres donantes se caracterizaron mediante electroforesis bidimensional. Los resultados revelaron que las muestras de donantes no presentaban excesiva variabilidad entre ellos, pero si se diferenciaban bastante, al menos en veinte proteínas, con la muestra del paciente infértil. Sobretudo dos proteínas se detectaron de forma más intensa en la muestra del paciente infértil, una fue la proteína de secreción de unión a la actina (*secretory actin-binding protein*) y la otra la proteína de fibra densa exterior 2/2 (*outer dense fibre protein 2/2*). Este caso representa una prueba de que la proteómica puede ser útil para estudiar los defectos en la función espermática. Pero debido a que los resultados no fueron muy concluyentes son necesarios más estudios para conseguir resultados más consistentes. Posteriormente, se han realizado más estudios buscando procesos moleculares alterados entre varones fértiles o no, como la actividad enzimática de la acrosina y su relación con la penetración en el óvulo o moléculas relacionadas con la apoptosis (Said et al., 2005).

En un trabajo publicado en 2007 por García-Herrero, se enumeraron 27 genes expresados y relacionados con el proceso de espermatogénesis en un grupo de donantes de semen. De ninguno de ellos se encontró expresión al estudiar a un grupo de pacientes infértiles con recuento normal. Por otra parte, se identificó un único gen en el grupo infértil, pero no en el grupo control. Este gen codifica para una proteína de la familia de las histonas H2B, específicas de testículo (*H2B histone family member W testis-specific o H2BWT*). Esta proteína es una histona atípica que no recluta factores de condensación de cromosomas y no participa en el ensamblaje de los cromosomas mitóticos. Es la primera vez en la que un grupo de investigación se plantea que puede existir una expresión génica diferente entre pacientes normozoospermicos fértiles y pacientes normales que no consiguen descendencia, abriendo así un nuevo campo de estudio en la fertilidad idiopática masculina.

Por tanto, es muy interesante el último resultado que hemos obtenido, en cuanto al grupo de pacientes normozoospermicos, pero que no consiguen descendencia. Aunque la expresión de clusterina está demostrando ser bastante compleja en el espermatozoide por las diferentes isoformas que presenta y la diferente localización que puede adoptar. Es probable que la expresión en el acrosoma, en una proporción adecuada, sea indicativa de un eyaculado normal y fértil, en base a su función en el correcto ensamblaje del acrosoma. Así cuando la expresión se vea disminuida en esta zona será indicativo de un seminograma

patológico, según nuestros resultados en eyaculados con concentración y movilidad alterada. Pero una expresión demasiado elevada, también indicará déficit en la fertilidad de un eyaculado, aún con un seminograma normal. Por ejemplo, en los casos en los que una alta expresión de la proteína pudiera estar potenciando su función de cluster o adhesión celular que no favorecerá al espermatozoide en su movimiento normal hacia la fecundación de un óvulo. Como consecuencia, podría existir una expresión diferente de clusterina en el acrosoma entre varones aparentemente normales, pero que no consiguen descendencia y aquellos que sí la consiguen. Para que esta conclusión fuera útil en el estudio de la infertilidad masculina idiopática, se hace necesario establecer un valor de expresión óptima, para lo cual serían necesarios más estudios comparativos por la variabilidad de los estudios realizados hasta la fecha.

#### **4. Relación de la expresión de clusterina y los resultados de un tratamiento de fecundación *in vitro*.**

Al analizar los resultados de los tratamientos *in vitro* y la expresión de la proteína, no hemos encontrado diferencias significativas para el porcentaje de fecundación de los óvulos inseminados. Tampoco en la relación entre la calidad de los embriones transferidos en el tratamiento y la expresión de la clusterina para ninguna de las técnicas usadas. Pero al evaluar el resultado del tratamiento, hemos obtenido que tanto un aumento en la expresión de clusterina en el acrosoma como un aumento en la expresión de la proteína sintetizada por el propio espermatozoide (valores de qRT-PCR) están relacionados con un fracaso en el tratamiento de fecundación *in vitro*. Aunque este último resultado es muy interesante, creemos que es precipitado a la vista del resto de resultados y lo expuesto anteriormente.

Una expresión muy elevada en el acrosoma parece que no favorece a la implantación del embrión en un tratamiento de fecundación *in vitro*, sin embargo no hemos podido relacionar esta alta expresión con una proporción de óvulos fecundados más baja, como postulábamos anteriormente, ya que podría estar también afectando a la capacidad fértil del espermatozoide. Una expresión elevada de clusterina medida por qRT-PCR también está relacionada con el fracaso del tratamiento. Es cierto que los espermatozoides usados para fecundar los óvulos en el tratamiento de fecundación *in vitro* son previamente seleccionados. Cuando la muestra del varón lo permite, será un espermatozoide lo más normal posible en cuanto a morfología y movilidad, ya que se selecciona uno a uno mediante observación bajo microscopio (técnica de microinyección espermática). Es, por tanto, difícil sacar conclusiones del estudio por la complejidad de los procesos implicados.

Hay que tener en cuenta que la expresión de un gen, por sí sólo, es muy difícil que explique una situación tan compleja como es el proceso de la fecundación de un óvulo o incluso, la consecución de un embarazo, ya que los genes y sus productos interaccionan unos con otros formando amplias redes de interacción, rutas metabólicas o cascada de señales para el inicio de un proceso celular. Por lo que entender un proceso biológico completo nos debe llevar al estudio global del proceso, definiendo un perfil de expresión génica con una interpretación funcional que nos ayude a entenderlo. Actualmente el abordaje del estudio de la infertilidad

masculina se ha orientado hacia la transcriptómica y la proteómica, concluyendo que en la infertilidad deben de activarse o desactivarse la expresión de distintos genes (García-Herrero et al., 2010).

Un estudio similar, donde se ha tratado de relacionar la expresión de una proteína con el resultado de un tratamiento de fecundación *in vitro* fue publicado en 2008 por el grupo de Martínez-Conejero. En él, se estudió la relación de la expresión de mucina (MUC1) con la tasa de fecundación tras realizar inseminación por ICSI, la calidad de los embriones obtenidos y la tasa de embarazo después del tratamiento. Comparando los tratamientos de ovodonación<sup>14</sup> con varones infértiles y donantes de semen, los resultados no dieron lugar a diferencias significativas.

Aunque nuestro estudio presenta un gran número de muestras y realiza un estudio comparativo entre varones sin descendencia y fértiles, creemos que se hace necesario aumentar el número de varones estudiados y evaluar la expresión de la proteína en cada una de las diferentes alteraciones que pueden obtenerse en un seminograma y sus diferentes combinaciones. Además, realizar el estudio en pacientes cuyas parejas acudan a fecundación *in vitro* únicamente diagnosticadas por un factor masculino, es decir, sin ninguna alteración que pueda ser relacionada con el factor femenino. Sería también interesante que las mujeres sometidas al tratamiento fuesen menores de 35 años, para que la respuesta al tratamiento hormonal y la calidad ovocitaria obtenida sea óptima e, incluso, estudiar ciclos de ovodonación para minimizar al máximo la influencia del factor femenino en el tratamiento.

Es necesario ampliar el estudio mediante técnicas basadas en la proteómica que nos permitan distinguir las diferentes isoformas de la clusterina y comparar las proporciones de las mismas entre varones con diferentes defectos en el seminograma y con fracasos en tratamientos de fecundación *in vitro*. Como se ha hecho visible en los resultados obtenidos, el estudio de expresión génica, no nos ha ayudado demasiado en las conclusiones del estudio. Tal vez la combinación de técnicas de proteómica donde podamos medir la proporción de cada una de las isoformas de la proteína con técnicas que permitan identificar su localización en el espermatozoide, que como hemos demostrado es clave, nos podrá ayudar a comprender de una forma global cómo es la expresión de clusterina en el espermatozoide y su implicación en la infertilidad. Queda aún camino que recorrer

---

<sup>14</sup> Tratamiento donde se usan óvulos procedentes de una donante, en lugar de los que pueda producir la propia mujer.

hasta poder usar la clusterina como un marcador útil de infertilidad, como un potencial biomarcador<sup>15</sup> de acción terapéutica, al menos si el estudio de expresión se hace de forma independiente, debido a la complejidad de su expresión en esta célula.

El análisis de expresión génica mediante técnicas más avanzadas como la secuenciación masiva o los arrays del transcriptoma integrando estudios genómicos, proteómicos y metabolómicos, que lleven a la elaboración de perfiles de expresión génica o proteómicos, será en un futuro cercano la clave para el completo estudio molecular del espermatozoide (Hamatani, 2012). En diferentes circunstancias es muy probable que la infertilidad esté producida por una cascada metabólica fallida o por el defecto en la transcripción de varios genes. Este estudio global con las herramientas adecuadas para su interpretación permitirá la identificación de diferentes biomarcadores, identificando posibles dianas para la actuación de fármacos (Rahman et al., 2013). Esta línea de investigación nos dará toda la información para resolver los enigmas actuales sobre la infertilidad masculina, permitiendo evaluar y tratar al varón con el fin de aumentar la probabilidad de embarazo y de hijo sano en casa, tras los tratamientos de fecundación *in vitro*.

---

<sup>15</sup> Parámetros biológicos que proveen información sobre el estado normal o patológico de un individuo.



## LIMITACIONES



Como se ha comentado en el apartado de discusión, aumentar el número de muestras en el grupo de pacientes para cada una de las alteraciones del seminograma, podría afianzar los resultados obtenidos. Debido a que el diseño experimental de este trabajo estableció evaluar pacientes durante un periodo de tiempo determinado, no nos permitió seleccionar previamente los grupos de varones por patología en el seminograma. Se realizó el estudio con aquellos varones que aceptaron participar, que cumplían los requisitos definidos para este trabajo y que realizaron un tratamiento de fecundación *in vitro* durante dicho periodo. Aun así este trabajo presenta un elevado número de pacientes analizados y es la primera comparación realizada entre varones con fertilidad probada y aquellos que no han conseguido descendencia de forma natural.

Este trabajo pretende ampliar el estudio del factor masculino, comparando la variabilidad en la expresión de un determinado gen entre distintos varones, relacionarlo con el diagnóstico clásico del seminograma y la capacidad fértil del varón. Por ese motivo, este estudio parte de muestras completas de eyaculado. Sería interesante ver si los resultados se equiparan en muestras previamente capacitadas, método por el cual se seleccionan y capacitan los espermatozoides móviles de un eyaculado, obteniéndose espermatozoides con una mayor capacidad fecundante. Pero esto limitaría uno de los objetivos de este estudio que es diferenciar la expresión de clusterina entre espermatozoides normales y anormales, ya que el número de espermatozoides anormales en una fracción capacitada es mínimo, mayoritariamente para la movilidad espermática.

Por el diseño del estudio realizado, no hemos podido limitar la influencia del factor femenino en los resultados del estudio. Con un aumento del número de muestras y la selección previa de pacientes que no hayan entrado en un programa de fecundación *in vitro* debido a una causa de esterilidad femenina o con algún tipo de patología relacionada, habríamos minimizado este factor de confusión. Factor que puede ser minimizado a máximo al incluir pacientes con ovocitos donados, pero esto no es factible en nuestro centro ya que en el periodo de realización de este trabajo, todos los casos susceptibles de entrar en un programa de ovodonación, fueron derivados a un centro externo como se indicaba en la guía de reproducción asistida del sistema sanitario andaluz. En la actualidad, nuestro centro está autorizado para realizar 4 tratamientos al año.

El estudio de perfiles genéticos o proteicos que actualmente está tomando mucha fuerza en el estudio de la infertilidad masculina, implica tecnología avanza como el espectrofotómetro de masas, el uso microarrays o incluso de secuenciación masiva. Tecnología que requiere una alta formación del investigador, además del elevado coste económico. No disponemos de esta tecnología en nuestro centro. Aún así, hemos realizado nuestro estudio con técnicas adecuadas para los objetivos marcados y hemos contribuido a mejorar el conocimiento sobre el papel que ejerce la clusterina en el espermatozoide.

## CONCLUSIONES



- La clusterina se expresa frecuentemente en espermatozoides, donde tiene un patrón de expresión variable dependiendo de su grado de madurez.
- Hemos detectado una nula expresión de clusterina nuclear mediante inmunohistoquímica, por lo que esta isoforma no debe ejercer una función primordial en el espermatozoide.
- Determinadas distribuciones de clusterina en el espermatozoide se correlacionan con diferentes alteraciones en el seminograma.
- Una alta expresión de clusterina en el acrosoma es un signo de bajo éxito reproductivo, siendo un marcador en pacientes infértiles con seminograma normal.
- La cantidad de clusterina expresada en el espermatozoide no nos informa sobre alteraciones en el mismo, al contrario que el patrón de distribución.
- Tanto una expresión de clusterina en el acrosoma como la expresión génica de clusterina determinada con la técnica qRT-PCR predice un test de gestación negativo tras un tratamiento de fecundación *in vitro*, probablemente la función de agregación espermática de la clusterina pueda influir en esta asociación.



## BIBLIOGRAFÍA



1. Agarwal SA, Said TM. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction*, 9: 331-45.
2. Agarwal A, Sharma RK, Prabakaran SA, Sundaram AT, Rosendahl S, Burns DH. (2006). Assessment of oxidative stress levels in semen using spectroscopy-based metabolomic profiling: implications in male infertility. Annual Meeting of the American Society For Reproductive Medicine New Orleans, LA, USA.
3. Aigelsreiter A, Janig E, Sostaric J, Pichler M, Unterthor D, Halasz J, Lackner C, Zatloukal K, Denk H. (2009). Clusterin expression in cholestasis, hepatocellular carcinoma and liver fibrosis. *Histopathology*, 54: 561-70.
4. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA. (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, 16: 31-8.
5. Alfarawati S, Wells D. (2013). Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Human Reproduction*, 28: 1707-15.
6. Alonso C, Cañadas MC, de la Fuente LA, García-Ochoa C, García JM, González V, Marcos M, Oliva R, Orera M. (2009). Recomendaciones para el estudio genético de la pareja con alteraciones en la reproducción. *Revista de Laboratorios Clínicos*, 2:196-203.
7. Altmäe S, Salumets A. (2011). A novel genomic diagnostic tool for sperm quality?. *Reproductive BioMedicine Online*, 22: 405-7.
8. American Society for Reproductive Medicine. (2012). Diagnostic evaluation of the infertile male: a comite opinion. *Fertility and Sterility*, 98: 294-301.
9. Amoako AA, Gebeh AK, Marczylo EL, Willets JM, Elson J, Marczylo TH, Konje JC. (2012). Impact of reference gene selection for type 2 cannabinoid receptor gene expression studies in human spermatozoa. *Andrologia*, 45: 278-84.

10. Andersen OM, Yeung Ch-H, Vorum H, Wellner M, Andreassen HK, Erdmann B, Mueller EC, Herz J, Otto A, Cooper TG, Willnow TE. (2003). Essential Role of the Apolipoprotein E Receptor-2 in Sperm Development. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 23989–95.
11. Aquila S, Rago V, Guido C, Casaburi I, Zupo S, Carpino A. (2008). Leptin and leptin receptor in pig spermatozoa: evidence of their involvement in sperm capacitation and survival. *Reproduction*, 136: 23-32.
12. Ashrafzadeh A, Karsani SA, Nathan S. (2013). Mammalian Sperm Fertility Related Proteins. *International journal of Medical Sciences*, 10:1649-57.
13. Atlas-White M, Murphy BF, Baker G. (2000). Localisation of clusterin in normal human sperm by immunogold electron microscopy. *Pathology*, 32: 258–61.
14. Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. (2007). The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction*, 22: 1413-19.
15. Bajari TM, Strasser V, Nimpf J, Schneider WJ. (2003). A model for modulation of leptin activity by association with clusterin. *FASEB Journal*, 17: 1505-7.
16. Bajo JM, Coroleu B. (2009). Fundamentos de Reproducción. Madrid, España: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia.
17. Balasuriya A, Speyer B, Serhal P, Doshi A, Harper JC. (2011). Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 22: 428–36.
18. Barroso G, Krivitzky K, Castelazo S, Carballo E. (2002). Changes in mitochondrial potentials and its exponential relation with phosphatidylserine translocation in the plasma membrane as markers

in the initial events of apoptosis: evaluation in different spermatic fractions. *Gynecology y Obstetric Mexico*, 70: 182-9.

19. Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Carani C, Madeo B, Tampieri A, Corti A. (2000). Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (Sulfated Glycoprotein 2) in human prostate cancer specimens. *Cancer Research*, 60: 28-34.
20. Bettuzzi S, Davalli P, Davoli S, Chayka O, Rizzi F, Belloni L, Pellacani D, Fregni G, Astancolle S, Fassan M, Corti A, Baffa R, Sala A. (2009). Genetic inactivation of ApoJ/clusterin: effects on prostate tumourigenesis and metastatic spread. *Oncogene*, 28: 4344-52.
21. Bettuzzi S, Scorcioni F, Astancolle S, Davalli P, Scaltriti M, Corti A. (2002). Clusterin (SPG-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV40-immortalized human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression. *Oncogene*, 21: 4328-34.
22. Biroccio A, D'Angelo C, Jansen B, Gleave ME, Zupi G. (2005). Antisense clusterin oligodeoxynucleotides increase the response of HER-2 gene amplified breast cancer cells to Trastuzumab. *Journal of Cellular Physiology*, 204: 463-9.
23. Boggs LN, Fuson KS, Baez M, Churgay L, McClure D, Becker G, May PC. (1996). Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid- $\beta$ (1-40) neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 67: 1324-7.
24. Boissonnas CC, Jouannet P, Jammes H. (2013). Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertility and Sterility*, 99: 624-31.
25. Buttyan R, Olsson CA, Pintar J, Chang C, Bandyk M. (1989). Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death. *Molecular and Cellular Biology*, 9: 3473-81.
26. Caccamo AE, Desenzani S, Belloni L, Borghetti AF, Bettuzzi S. (2006). Nuclear clusterin accumulation during heat shock response: implications for cell survival and thermo-tolerance induction in

immortalized and prostate cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 207: 208-19.

27. Calero M, Rostagno A, Frangione B, Ghiso J. (2005). Clusterin and Alzheimer's disease. *Subcellular Biochemistry*, 38: 273-98.
28. Califice S, Waltregny D, Castronovo V, Van den Brûle F. (2004). Prostate carcinoma cell lines and apoptosis: a review. *Revue Médicale Liège*, 59: 704-10.
29. Cao C, Shinohara ET, Li H, Niermann KJ, Kim KW, Sekhar KR, Gleave M, Freeman M, Lu B. (2005). Clusterin as a therapeutic target for radiation sensitization in a lung cancer model. *International Journal of Radiation Oncology-Biology-Physics*. 63: 1228-36.
30. Carlsson L, Ronquist G, Nilsson O, Larsson A. (2004). Dominant Prostate Immunogens for Sperm Agglutinating Autoantibodies of Infertile Men. *Journal of Andrology*, 25: 699-705.
31. Carrell D. (2012). Epigenetics of the male gamete. *Fertility and Sterility*, 97: 267-74.
32. Cassuto N, Hazout A, Hammoud I, Balet R, Da B, Barak Y, Jellad S, Plouchart JM, Selva J, Yazbeck C. (2012). Correlation between DNA defect and sperm-head Morphology. *Reproductive BioMedicine Online*, 24: 211-18.
33. Chaiwatanasirikul KA, Sala A. (2011). The tumour-suppressive function of CLU is explained by its localisation and interaction with HSP60. *Cell Death and Disease*, 219: 1-10.
34. Chayka O, Corvetta D, Dews M, Caccamo AE, Piotrowska I, Santilli G, Gibson S, Sebire NJ, Himoudi N, Hogarty MD, Anderson J, Bettuzzi S, Thomas-Tikhonenko A, Sala A. (2009). Clusterin, a haploinsufficient tumor suppressor gene in neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 101: 663-77.
35. Choi-Miura NH, Takahashi Y, Nakano Y, Tobe T, Tomita M. (1992).

Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (apolipoprotein-J). *Nature Biotechnology*, 21: 660-6.

36. Cisternas P, Moreno R. (2006). Comparative analysis of apoptotic pathways in rat, mouse and hamster spermatozoa. *Molecular Reproduction and development*, 73:1318-25.
37. Cochrane DR, Wang Z, Muramaki M, Gleave ME, Nelson CC. (2007). Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 2278-87.
38. Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. (2013). The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics*, 68:15-26.
39. Courant F, Antignac JP, Monteau F, Le brzec B. (2013). Metabolomics as a potential new approach for investigating human reproductive disorders. *Journal of proteome research*, 12: 2914-20.
40. Cram DS, O'Bryan MK, De Kretser DM. (2001) Male infertility genetics-the future. *Journal of Andrology*, 22: 738-46.
41. Cruz I, Colmenares M, Berrueta-Carrillo L, Gómez-Pérez R. (2010). Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen. *Investigación Clínica*, 51: 87-99.
42. Das P, Paria N, Gustafson-Seabury A, Vishnoi M, ChakI S, Love C, Varner D, Chowdhary B, Raudsepo T. (2010). Total RNA isolation form stallion sperm and testis biopsias. *Theriogenology*, 74: 1099-106.
43. De Iuliis GN, Wingate JK, Koppers AJ, McLaughlin EA, Aitken RJ. (2006). Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism*, 91: 1968-75.
44. De Silva HV, Harmony JA, Stuart WD, Gil CM, Robbins J. (1990). Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry*, 29: 5380-9.

45. De Silva HV, Stuart WD, Park YB, Maon SJ, Gil CM, Wetterau JR, Busch SJ, Harmony JA. (1990). Purification and characterization of Apolipoprotein J. *Journal of Biology Chemistry*, 265: 14292-7.
46. Deepinder F, Chowdary HT, Agarwal A. (2007). Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 7: 351-8.
47. Devauchelle V, Essabbani A, De Pinieux G, Germain S, Tourneur L, Mistou S, Margottin-Goguet F, Anract P, Migaud H, Le Nen D, Lequerré T, Saraux A, Dougados M, Breban M, Fournier C, Chiochia G. (2006). Characterization and functional consequences of underexpression of clusterin in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology*, 177: 6471-9.
48. Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO. (2002). Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human Reproduction*, 17: 13-16.
49. Dubin M, Stoppani A. (2000). Muerte celular programada y apoptosis función de las mitocondrias. *Medicina (Buenos Aires)*, 60: 375-86.
50. Dumont P, Chainiaux F, Eliaers F, Petropoulou C, Remacle J, Koch-Brandt C, Gonos E, Toussaint O. (2002) Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones*, 7: 23-35.
51. Esteves SC, Sharma RK, Gosálvez J, Agarwal A. (2014). A translational medicine appraisal of specialized andrology testing in unexplained male infertility. *International Urology and Nephrology*, 46:1037-52.
52. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. (2007). Male infertility: role of genetic background. *Reproductive BioMedicine Online*, 14: 734-45.

53. Fink TM, Zimmer M, Tschopp J, Etienne J, Jenne DE, Lichter P. (1993). Human Clusterin (CLI) Maps to 8p21 in Proximity to the Lipoprotein Lipase (LPL) Gene. *Genomics*, 16: 526-8.
54. French LE, Wohlwend A, Sappino AP, Tschopp J, Schifferli JA. (1994). Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *Journal of Clinical Investigation*, 93: 877-84.
55. Fritz IB, Burdzy K, Setchells B, Blaschuk O. (1983). Ram rete testis fluid contains a protein (Clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biology of Reproduction*, 28: 1173-88.
56. Frühmesser A, Vogt P, Zimmer J, Witsch-Baumgartner M, Fauth C, Zschocke J, Pinggera GM, Kotzot D. (2013). Single nucleotide polymorphism array analysis in men with idiopathic azoospermia or oligoasthenozoospermia syndrome. *Fertility and Sterility*, 100:81-7.
57. García-Herrero S, Garrido N, Martínez-Conejero JA. (2007). Microarray analysis of infertile males in absence of abnormal sperm count reveals profound expression changes in spermatogenesis related gene products. Abstracts of the 2nd IVI International Congress. Barcelona, España.
58. García-Herrero S, Garrido Puchalt N, Pellicer Martínez A, Remohí Giménez J, Martínez Conejero JA, Meseguer Escrivá M. (2010). Perfiles de expresión génica en hombres infértiles que se someten a reproducción asistida. *Revista del Laboratorio Clínico*, 3: 108-17.
59. Gleave ME, Miyake H, Zellweger T, Chi K, July L, Nelson C, Rennie P. (2001). Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, clusterin/testosterone-repressed prostate message 2, to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer. *Urology*, 58: 39-49.
60. Griffiths GS, Galileo DS, Aravindan RG, Martin-DeLeon PA. (2009). Clusterin facilitates exchange of glycosyl phosphatidylinositol-Linked

SPAM1 between reproductive luminal fluids and mouse and human sperm membranes. *Biology of Reproduction*, 81: 562–70.

61. Hamada N, Miyata M, Eto H, Ikeda Y, Shirasawa T, Akasaki Y, Miyauchi T, Furusho Y, Nagaki A. (2011). Loss of clusterin limits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced expression of Egr-1 and TNF- $\alpha$ . *Journal Atherosclerosis Thrombosis*, 18: 209-16.
62. Hamatani T. (2012). Human spermatozoa RNAs. *Fertility and Sterility*, 97: 275-81.
63. Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS. (1997). Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 18644-9.
64. Han Z, Wang Z, Cheng G, Liu B, Li P, Li J, Wang W, Yin C, Zhang W. (2012). Presence, localization, and origin of clusterin in normal human spermatozoa. *Journal Assisted Reproductive Genetic*, 29: 751–7.
65. Harper J, Sengupta S. (2012). Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Human Genetic*, 131: 175-86.
66. Hassan MK, Watari H, Han Y, Mitamura T, Hosaka M, Wang L, Tanaka S, Sakuragi N. (2011). Clusterin is a potential molecular predictor for ovarian cancer patient's survival: targeting clusterin improves response to paclitaxel. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30:113.
67. He HZ, Song ZM, Wang K, Teng LH, Liu F, Mao YS, Lu N, Zhang SZ, Wu M, Zhao XH. (2004). Alterations in expression, proteolysis and intracellular localizations of clusterin in esophageal squamous cell carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 10: 1387-91.
68. Hoeller C, Pratscher B, Thallinger C, Winter D, Fink D, Kovacic B, Sexl V, Wacheck V, Gleave ME, Pehamberger H, Jansen B. (2005).

Clusterin Regulates Drug-Resistance in Melanoma Cells. *Journal of Investigate Dermatology*, 24: 1300–7.

69. Howes EA, Hurst S, Laslop A, Jones R. (1998). Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin,  $\beta$ -chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 4: 673-81.
70. Humphreys DT, Carver JA, Easterbrook-Smith SB, Wilson MR. (1999) Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 6875-81.
71. Hurtado MV, Cuadros AJ. (2008). Cuadernos de embriología clínica II. Criterios de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos, 2ª Edición. ASEBIR (Asociación para el estudio de la biología de la reproducción). Madrid, España.
72. Hye-Young S, Mi-Kyung K, Yun-A J, Byoung Kuk J, Eun-Kyung Y, Keun-Gyu P, In-Kyu L. (2013). Clusterin Decreases Hepatic SREBP-1c Expression and Lipid Accumulation. *Endocrinology*, 154: 1722–30.
73. Ibrahim NM, Gilbert GR, Loseth KJ, Crabo BC. (2000). Correlation between Clusterin-Positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *Journal of Andrology*, 21: 887-94.
74. Ibrahim NM, Foster DN, Crabo BG. (2001). Localization of clusterin on freeze-preserved bull spermatozoa before and after glass wool-sephadex filtration. *Journal of Andrology*, 22: 891-902.
75. Ibrahim NM, Romano JE, Troedsson MT, Crabo BG. (2001). Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. *Journal of Andrology*, 22: 863-77.
76. Iammarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C. (2003). Male infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2: 211-29.

77. James RW, Hochstrasser AC, Borghini I, Martin B, Pometta D, Hochstrasser D. (1991). Characterization of a human high density lipoprotein-associated protein, NA1/NA2. Identity with SP-40,40, an inhibitor of complement-mediated cytolysis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 11: 645-52.
78. Janig E, Haslbeck M, Aigelsreiter A, Braun N, Unterthor D, Wolf P, Khaskhely NM, Buchner J, Denk H, Zatloukal K. (2007). Clusterin associates with altered elastic fibers in human photoaged skin and prevents elastin from ultraviolet-induced aggregation in vitro. *The American Journal of Pathology*, 171: 1474-82.
79. Jarow JP. (2007). Diagnostic approach to the infertile male patient. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 36: 297-311.
80. Jenne DE, Lowin B, Peitsch MC, Böttcher A, Schmitz G, Tschopp J. (1991). Clusterin (Complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma. *Journal of Biology and Chemistry*, 266: 11030-6.
81. Jia Y, Castellanos J, Wang C, Sinha-Hikim I, Lue Y, Swerdloff R, Sinha-Hikim A. (2009). Mitogen-activates protein kinase signalling in male germ cell apoptosis in the rat. *Biology of reproduction*, 80: 771-80.
82. Jones SE, Jomary C. (2002). Clusterin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34: 427-31.
83. Kang YK, Hong SW, Lee H, Kim WH. (2004). Overexpression of clusterin in human hepatocellular carcinoma. *Human Pathology*, 35: 1340-6.
84. Kennedy C, Ahlering P, Rodriguez H, Levy S, Sutovsky P. (2011). Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*, 22: 272-6.

85. Kirschbaum L, Sharpe JA, Murphy B, D'Apice A, Classon B, Hudson P, Walker ID. (1989). Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems. *The EMBO Journal*, 8: 711-8.
86. Klock G, Baiersdörfer M, Koch-Brandt C. (2009) Cell Protective Functions of Secretory Clusterin (sCLU). *Advances in Cancer Research*, 104: 115-38.
87. Koch-Brandt C, Morgans C. (1996). Clusterin: a role in cell survival in the face of apoptosis?. *Journal of Progress in molecular and subcellular biology*, 16: 130-49.
88. Koltai T. (2014). Clusterin: a key player in cancer chemoresistance and its inhibition. *Journal of OncoTargets and Therapy*, 7: 447–56.
89. Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ. (2013). The use of genomic, proteomics and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertility and Sterility*, 99: 998-1007.
90. Krausz C, Giachini C. (2007). Genetic risk factors in male infertility. *Archives of Andrology*, 53: 125-33.
91. Krawetz S, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Antón E, Draghici S, Diamond M. (2011). A survey os small RNAs in human sperm. *Human Reproduction*, 26: 3401-12.
92. Krijnen PA, Cillessen SA, Manoe R, Muller A, Visser CA, Meijer CJ, Musters RJ, Hack CE, Aarden LA, Niessen HW. (2005). Clusterin: a protective mediator for ischemic cardiomyocytes. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289: 2193–202.
93. Kurahashi T, Muramaki M, Yamanaka K, Hara I, Miyake H. (2005). Expression of the secreted form of clusterin protein in renal cell carcinoma as a predictor of disease extension. *BJU International*, 96:895-9.

94. Kwan-Hee Y, Young-Mi J, O-Yu K. (2003). Clusterin Overexpression is Responsible for the Anti-apoptosis Effect in a Mouse Neuroblastoma Cell Line, B103. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 58: 148-51.
95. Lamb DJ. (2010). Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing. *Asian Journal of Andrology*. 12: 64-70.
96. Lee C, Atanelov L, Modrek B, Xing Y. (2003). ASAP: the Alternative Splicing Annotation Project. *Nucleic Acids Research*, 31: 101-5.
97. Leskov KS, Klokov DY, Li J, Kinsella TJ, Boothman DA. (2003). Synthesis and Functional Analyses of Nuclear Clusterin, a Cell Death Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 13: 11590-600.
98. Lokamani I, Looi ML, Ali SA, Dali AZ, Jamal R. (2011). Clusterin as a potential marker in distinguishing cervical neoplasia. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 33:223-8.
99. Martínez-Conejero JA, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Simon C, Meseguer M. (2008). MUC1 in human testis and ejaculated spermatozoa and its relationship to male fertility status. *Fertility and Sterility*, 90: 450-2.
100. Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. (2008). Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Human Reproduction*, 23: 783-91.
101. Matsuda A, Itoh Y, Koshikawa N, Akizawa T, Yana I, Seiki M. (2003). Clusterin, an abundant serum factor, is a possible negative regulator of MT6-MMP/MMP-25 produced by neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 36350-7.
102. Mattmueller DR, Hinton BT. (1990). In vivo secretion and association of clusterin (SGP-2) in luminal fluid with spermatozoa in the rat testis and epididymis. *Molecular reproduction and development*, 30: 62-9.

103. May-Panloup P, Malinge MC, Larget-Piet L, Chretien MF. (2001). Genetic male infertility and medically assisted reproduction. *Gynecologie, Obstetrique et Fertilité*, 29: 583-93.
104. Michel D, Chatelain G, North S, Brun G. (1997). Stress-induced transcription of the Clusterin/Apo J gene. *Biochemical Journal*, 328: 45-50.
105. Miller D, Ostermeier GC. (2006). Spermatozoal RNA: why is it there and what does it do?. *Gynécologie Obstétrique and Fertilité*, 34: 840-6.
106. Morales CR, Igdoura SA, Wosu UA, Boman J, Argraves WS. (1996). Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-2 Expression in Efferent Duct and Epididymal Epithelia: Evidence in Rats for Its In Vivo Role in Endocytosis of Apolipoprotein J/Clusterin. *Biology of Reproduction*, 55: 676-83.
107. Moreno JM, Castilla JA, Gómez E, Palacios E. (2012). Indicadores de Calidad basados en el estado del Arte. Ponencia. XXIX Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 29: 44-46.
108. Moretti RM, Marelli MM, Mai S, Cariboni A, Scaltriti M, Bettuzzi S, Limonta P. (2007). Clusterin isoforms differentially affect growth and motility of prostate cells: possible implications in prostate tumorigenesis. *Journal of Cancer Research*, 67: 10325-33.
109. Mourra N, Couvelard A, Tiret E, Olschwang S, Flejou JF. (2007). Clusterin is highly expressed in pancreatic endocrine tumours but not in solid pseudopapillary tumours. *Histopathology*, 50: 331-7.
110. Murphy BF, Kirszbaum L, Walker ID, D'Apice A. (1988) SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *Journal of Clinical Investigation*, 81: 1858-64.

111. Nicholson JK, Lindon JC. (2008) Metabolomic. *Nature*, 445: 1054-56.
112. Nizard P, Tetley S, Le Dréan Y, Watrin T, Le Goff P, Wilson MR, Michel D. (2007). Stress-induced retrotranslocation of clusterin/apoj into the cytosol. *Traffic*, 8: 554-65.
113. O'Bryan MK, Baker WG, Saunders JR, Kirszbaum L, Walker D, Hudson P, Liu DY, Glew MD, D'Apice AF, Murphy BF. (1990). Human Seminal Clusterin (SP-40,40). Isolation and Characterization. *Journal Clinin Investigation*, 85: 1477-86.
114. O´Bryan M, Murphy B, Liu D, Clarke G, Baker H. (1994). The use of anticlusterin monoclonal antibodies for the combined assessment of human sperm morphology and acrosome integrity. *Human reproduction*, 9: 1490-96.
115. O´Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. (2005). Reactive oxygen species and protein kinases modulate the level of phospho-MEK-like proteins during human sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 73:94-105.
116. O´Sullivan J, Drake LW, Tenniswood M. (2003). Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis. *Cell Death Differentiation*, 10: 914-27.
117. Oliva R, Castillo J. (2011). Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian Journal of Andrology*, 13: 24-30.
118. Olsen J, Ramlau-Hansen CH. (2014). Epidemiologic methods for investigating male fecundity. *Asian Journal of Andrology*, 16: 17-22.
119. Oracova E, Kasikova K, Prinosilova P, Rybar R, Horinova V, Gaillyova R, Rubes J. (2013). Balanced chromosomal translocations in men: relationships among semen parameters, chromatin integrity, sperm meiotic segregation and aneuploidy. *Journal of Assist Reproduction Genetic*, 30: 391-405.

120. Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Francavilla S, Lenzi A, Lombardo F, Gandini L. (2011). Mitochondrial membrane potencial profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertility and Sterility*, 95: 2315-9.
121. Patassini C, Garolla A, Bottacin A, Menegazzo M, Speltra E, Foresta C, Ferlin A. (2013). Molecular karyotyping of human single sperm by array- comparative genomic hybridization. *PLoS ONE*, 8: e60922.
122. Pearse MJ, O'Bryan M, Fisicaro N, Rogers L, Murphy B, D'Apice AJ. (1992). Differential expression of clusterin in inducible models of apoptosis. *International Immunology*, 4: 1225-31.
123. Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Bjorndahl L. (2004). Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. *Human Reproduction*, 19: 1438-47.
124. Pizzol D, Ferlin A, Garolla A, Lenzi A, Bertoldo A, Foresta C. (2014). Genetic and molecular diagnostics of male infertility in the clinical practice. *Frontiers in Bioscience*, 19: 291-303.
125. Poon S, Easterbrook-Smith SB, Rybchyn MS, Carver JA, Wilson MR. (2000). Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry*, 39:15953-60.
126. Pucci S, Bettuzzi S. (2009). The Shifting Balance Between CLU Forms During Tumor Progression. *Advances in Cancer Research*, 104: 25-32.
127. Rahman S, Lee JS, Kwon WS, Pang MG. (2013). Sperm Proteomics: Road to Male Fertility and Contraception. *International Journal of Endocrinology*, 1-11.
128. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. (2013). An improvement of the 2<sup>^</sup>

(delta-delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3: 71–85.

129. Reddy KB, Karode MC, Harmony AK, Howe PH. (1996). Interaction of transforming growth factor  $\beta$  receptors with apolipoprotein J/clusterin. *Biochemistry*, 35: 309-14.
130. Redondo M, Esteban F, González-Moles MA, Delgado-Rodríguez M, Nevado M, Torres-Muñoz JE, Tellez T, Villar E, Morell M, Petito CK. (2006). Expression of the antiapoptotic proteins clusterin and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinomas. *Tumour Biology*, 27: 195-200.
131. Redondo M, Rodrigo I, Alcalde J, Tellez T, Roldan J, Funez R, Díaz-Martín A, Rueda A, Jiménez E. (2010). Clusterin expression is associated with decreased disease free survival of patients with colorectal carcinomas. *Histopathology*, 56: 932–6.
132. Redondo M, Tellez T, Roldan MJ. (2009). The role of clusterin (CLU) in malignant transformation and drug resistance in breast carcinomas. *Advances in Cancer Research*, 105: 21-43.
133. Redondo M, Tellez T, Roldan MJ, García-Aranda M, Serrano A, Hortas ML, Morell M. (2007). Anticlustarin treatment of breast cancer cells increases chemotherapy- and tamoxifen-sensitivity and counteracts the inhibitory action of dexamethasone on chemotherapy-induced cytotoxicity. *Breast Cancer Research*, 9: R86.
134. Redondo M, Villar E, Torres-Muñoz J, Tellez T, Morell M, Petito C. (2000). Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 157: 393-9.
135. Rizzi F, Coletta M, Bettuzzi S. (2009). Clusterin (CLU): From One Gene and Two Transcripts to Many Proteins. *Advances in Cancer Research*, 104: 9-23.
136. Rodríguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO Journal*, 16:

2262–70.

137. Saffer H, Wahed A, Rassidakis GZ, Medeiros J. (2002). Clusterin expression in malignant lymphomas: a survey of 266 cases. *Modern Pathology*, 15: 1221–6.
138. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of reproduction*, 66: 1061-67.
139. Savković V, Gantzer H, Reiser U, Selig L, Gaiser S, Sack U, Klöppel G, Mössner J, Keim V, Horn F, Bödeker H. (2007). Clusterin is protective in pancreatitis through anti-apoptotic and anti-inflammatory properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356:431-7.
140. Scaltriti M, Bettuzzi S, Sharrard RM, Caporali A, Caccamo AE, Maitland NJ. (2004). Clusterin overexpression in both malignant and non-malignant prostate epithelial cells induces cell cycle arrest and apoptosis. *British Journal of Cancer*, 91: 1842-50.
141. Schrijvers E, Koudstaal P, Hofman A, Breteler M. (2011). Plasma Clusterin and the Risk of Alzheimer Disease. *Journal of American Medicinal Association*, 305: 1322-26.
142. Sensibar JA, Qian Y, Griswold MD, Sylvester SR, Bardin CW, Cheng CY, Lee C. (1993). Localization and molecular heterogeneity of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) among ventral prostate, seminal vesicle, testis, and epididymis of rats. *Biology of Reproduction*, 49: 233-42.
143. Serrano A, Redondo M, Tellez T, Castro-Vega I, Roldan MJ, Mendez R, Rueda A, Jimenez E. (2009). Regulation of Clusterin expression in human cancer via DNA methylation. *Tumor Biology*, 30: 286-91.
144. Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilden W, Reichrath J. (2006). Challenge and promise: roles for clusterin in

pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death and Differentiation*, 13: 12–9.

145. Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Hamada AJ, Gopalan B, Willard B, Yadav S, Du Plessis S. (2013). Proteomic analysis of human spermatozoa proteins with oxidative stress. *Reproductive Biology and Endocrinology*, doi: 10.1186/1477-7827-11-48.
146. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ. (2005). Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertility and Sterility*, 83: 1442-6.
147. Silkensen JR, Skubitz KM, Skubitz A, Chmielewski D, Manivel JC, Dvergsten JA, Rosenberg M. (1995). Clusterin Promotes the Aggregation and Adhesion of Renal Porcine Epithelial Cells. *Journal of Clinical and Experimental Investigation*, 96: 2646-53.
148. Stahl P, Stember D, Goldstein M. (2012). Contemporary management of male infertility. *Annual Review of Medicine*, 63: 525-40.
149. Stewart EM, Aquilina JA, Easterbrook-Smith SB, Murphy-Durland D, Jacobsen C, Moestrup S, Wilson MR. (2007). Effects of glycosylation on the structure and function of the extracellular chaperone clusterin. *Biochemistry*, 46: 1412-22.
150. Strocchi P, Smith MA, Perry G, Tamagno E, Danni O, Pession A, Gaiba A, Dozza B. (2006). Clusterin up-regulation following sub-lethal oxidative stress and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. *Neurobiol Aging*, 27: 1588.
151. Sylvester SR, Morales C, Oko R, Griswold MD. (1991). Localisation of sulphated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biology of reproduction*, 45: 195-207.
152. Takahashi M, Lin YM, Nakamura Y, Furukawa Y. (2004). Isolation and characterization of a novel gene CLUAP1 whose expression is frequently upregulated in colon cancer. *Oncogene*, 23: 9289-94.

153. Tang M, Li J, Liu B, Song N, Wang Z, Yin C. (2013). Clusterin expression and human testicular seminoma. *Medical Hypotheses*, 81:635-7.
154. Teppa-Garrán A, Palacios-Torres A. (2004). Current evaluation of male infertility. *Investigation Clinical*, 45: 355-70.
155. Thacker S, Yadav S, Sharma R, Kashou A, Willard B, Zhang D, Agarwal A. (2011). Evaluation of Sperm Proteins in Infertile Men: A Proteomic Approach. *Fertility and Sterility*, 95: 2745-8.
156. Thomas-Tikhonenko A, Viard-Leveugle I, Dews M, Wehrli P, Sevignani C, Yu D, Ricci S, el-Deiry W, Aronow B, Kaya G, Saurat JH. y French L.E. (2004). Myc-transformed epithelial cells down-regulate clusterin, which inhibits their growth in Vitro and carcinogenesis in vivo. *Cancer Research*, 64: 3126-36.
157. Torres-Muñoz JE, Redondo M, Czeisler C, Roberts B, Tacoronte N, Petite CK. (2001) Upregulation of glial clusterin in brains of patients with AIDs. *Brain Research*, 888: 297-301.
158. Toshimori K. (1998). Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell and Tissue Research*, 293: 177-87.
159. Trougakos I, Gonos E. (2002). Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 34: 1430-48.
160. Trougakos I, Poulakou M, Stathatos M, Chalikia A, Melidonis A, Gonos ES. (2002). Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction. *Experimental Gerontology*, 37: 1175-87.

161. Tung P, Burdzy K, Wong K, Fritz IB. (1992). Competition between cell-substratum interactions and cell-cell interactions. *Journal of Cell Physiology*, 152: 410-21.
162. Vaquero M. (2007). Manual de Calidad de Inmunohistoquímica en Anatomía Patológica. Servicio de Anatomía patológica. Hospital Donosita Osakidetza. San Sebastián, España.
163. Viard I, Wehrli P, Jornot L, Bullani R, Vechietti JL, Schifferli JA, Tschopp J, French L.E. (1999). Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress. *Journal of Investigative Dermatology*, 112: 290-6.
164. Wasilk A, Callahan J, Christopher-Hennings J, Gay T, Fang Y, Dammen M, Reos M, Torremorell M, Polson D, Mellencamp M, Nelson E, Nelson W. Detection of U.S., Lelystad, and European-Like Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses and Relative Quantitation in Boar Semen and Serum Samples by Real-Time PCR. *Journal of Clinical microbiology* 2004; 42(10): 4453-61.
165. Wiggins AK, Shen PJ, Gundlach AL. (2003). Delayed, but prolonged increases in astrocytic clusterin (ApoJ) mRNA expression following acute cortical spreading depression in the rat: evidence for a role of clusterin in ischemic tolerance. *Molecular Brain Research*, 114: 20-30.
166. Winters BR, Walsh TJ. (2014) The Epidemiology of Male Infertility. *Urologic Clinics of North America*, 41: 195-204.
167. World Health Organization. (1999). WHO Laboratory Manual for examination of Human Semen. Cambridge University Press. Cambridge.
168. World Health Organization. (2010). WHO Laboratory Manual for the examination and processing of Human Semen. Department of Reproductive Health and Research. Ginebra, Suiza.
169. Wong P, Borst DE, Farber D, Danciger JS, Tenniswood M, Chader GJ, Van Veen T. (1994). Increased TRPM-2/clusterin mRNA levels during

the time of retinal degeneration in mouse models of retinitis pigmentosa. *Biochemistry and Cell Biology*, 72: 439-46.

170. Wong P, Taillefer D, Lakins J, Pineault J, Chader G, Tenniswood M. (1994). Molecular characterization of human TRPM-2/Clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*, 221:917-25.
171. Wu ZC, Yu JT, Li Y, Tan L. (2012). Clusterin in Alzheimer's disease. *Advances in clinical Chemistry*, 56:155-73.
172. Xie M, Yoshiharu M, Shi-Bing S, Hisatsugu M, Koushiro O, Fujitsugu M, Norio S. (2002). Expression of Clusterin in Human Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 25: 234-8.
173. Yang C, Leskov K, Hosley-Eberlein K, Criswell T. (2000). Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 5907-12.
174. Yang CR, Yeh S, Leskov K, Odegaard E, Hsu HL, Chang C, Kinsella TJ, Chn DJ, Boothman DA. (1999) Isolation of Ku70-binding proteins (KUBs). *Nucleic Acids Research*, 27: 2165-74.
175. Yuan S, Xu S. (2003). Leydig cell apoptosis and its regulation. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 9: 218-25.
176. Zalata A, El-Samanoudy A, Salan D, El-Baiomy Y, Taymour M, Mostafa T. (2012). Seminal Clusterin Gene Expression Associated with Seminal Variables in Fertile and Infertile Men. *The Journal of Urology*, 188: 1260-4.
177. Zhang LY, Ying WT, Mao YS, He HZ, Liu Y, Wang HX, Liu F, Wang K, Zhang DC, Wang Y, Wu M, Quian XH, Zhao XH. (2003). Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World Journal of Gastroenterology*, 9: 650-4.

178. Zhang Q, Wei Z, Shilajit K. (2006). The leader sequence triggers and enhances several functions of clusterin and is instrumental in the progression of human prostate cancer in vivo and in vitro. *BJU International*, 98: 452–60.

**BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL. REFERENCIAS WEB:**

NCBI Gene:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=1191>

## ANEXOS



**Anexo I. Certificado de comité de ética.**



Agencia Sanitaria Costa del Sol  
CONSEJERÍA DE SALUD



Distrito Sanitario Costa del Sol  
Servicio Andaluz de Salud  
CONSEJERÍA DE SALUD

**DICTAMEN FAVORABLE  
COMITÉ ÉTICA DE INVESTIGACIÓN  
COSTA DEL SOL**

FRANCISCO RIVAS RUIZ, COMO SECRETARIO DEL COMITÉ ÉTICO DE  
INVESTIGACIÓN COSTA DEL SOL,

**CERTIFICA**

Que este Comité ha ponderado y evaluado en sesión extraordinaria del Subcomité de Evaluación Permanente del 17 de febrero de 2012, el proyecto titulado "*Estudio de genes de supervivencia en espermatozoides y relación con la tasa de fertilidad*", cuyo Investigador Principal es María Luisa Hortas Nieto.

Lo que firmo en Marbella a 17 de febrero de 2012



Fdo. Francisco Rivas Ruiz  
Secretario del CEI Costa del Sol

## Anexo II. Petición estudio andrológico.



Agencia Sanitaria Costa del Sol  
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

Formulario de solicitud de  
seminograma. (Doctor)  
COD: FO-RA-009 D  
Fecha: 29/01/2015

### SOLICITUD Y DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA ESTUDIO ANDROLÓGICO (SEMINOGRAMA)

Nombre y Apellidos:..... NHC:.....

Fecha de nacimiento:.....

Nombre y Apellidos: ..... NHC: .....  
(pareja/cónyuge) (pareja/cónyuge)

MÉDICO:..... Motivo de estudio:.....

Tipo de Estudio:

- SEMINOGRAMA 1ª VEZ (incluye CULTIVO)     SEMINOGRAMA SEGUIMIENTO     CAPACITACIÓN     CONTROL POST VASECTOMÍA

**Cita previa:** Ud debe Solicitar cita en 951 976 776; de 9:00-14:00h Lunes a viernes laborables.

#### Normas para la recogida de semen:

1. Ud deberá tener una eyaculación 4 días antes del día de la prueba, y no volver a eyacular hasta el día de la recogida (nunca superior a 6 días), para que sus espermatozoides tengan la mejor vitalidad.
2. Es recomendable que orine antes de la recogida de la muestra.
3. No se lave los genitales con jabón, al menos 6h antes de la obtención de la muestra.
4. Debe recoger TODO EL VOLUMEN del eyaculado, ya que puede reducir el conteo de espermatozoides.
5. Recoja muestra **EXCLUSIVAMENTE** por masturbación. No debe utilizar preservativos ni métodos como el coito interrumpido, ya que perderemos alguna parte de la muestra.
6. Utilice únicamente frascos estériles de boca ancha (se dispensan en Farmacias).
7. Una vez recogida la muestra, se tapaná el bote inmediatamente.
8. Transportar la muestra inmediatamente al laboratorio, sin dejar que se enfríe, en un máximo de 45 min. Si Ud vive lejos, puede recoger la muestra en nuestro Hospital. Los espermatozoides se mueren con el tiempo y las temperaturas extremas; ino lo guarde en la nevera ni lo esponga directamente al sol!. Esto no es necesario en estudios postvasectomía.
9. Entregará la muestra el día citado en la Zona de Recogida de Muestras del Laboratorio en la planta baja del Hospital Costa de Sol, Autovía A-7 km 187, Marbella.

#### **MUY IMPORTANTE:**

No seguir estas instrucciones, afectará a los resultados de la calidad del semen

Por favor; rellene estos datos antes de entregar la muestra (A rellenar por el paciente)

Fecha:.....Hora Recogida:.....Hora de entrega:..... Días de abstinencia:.....

¿Ha tenido algún problema en la recogida?:.....

Ud declara que la muestra que entrega para su exámen es suya:

**(Por favor, firme)**

Autorización de la pareja o terceros para entrega de muestras (deberán venir identificados con DNI):

El paciente autoriza a.....con DNI.....a entregar en su nombre la muestra en el laboratorio

**(Firma del paciente)**

**Anexo III. Formulario de historia clínica de reproducción (software Doctor).**

**- CONTROL DE CICLOS**

Nº de ciclos:   Cancelado  Antagonista Forma Antagonista:  Orgalutran/ Cetrotide

Agonista Forma Agonista:  Synarel spray/ Procrin  ACO Estradio0:  Fechaestrad0:  00/00/0000

FSH:  HMG:  MENOPUR HCG:  OVITRELLE

Adyuvante:  Fur:  00/00/0000

|    | Fecha      | Día del ciclo | Doctor que atiende | OD | OI | edm | FSH | LH |
|----|------------|---------------|--------------------|----|----|-----|-----|----|
| 1. | 00/00/0000 | 0             |                    |    |    |     | 0   | 0  |
| 2. | 00/00/0000 | 0             |                    |    |    |     | 0   | 0  |
| 3. | 00/00/0000 | 0             |                    |    |    |     | 0   | 0  |
| 4. | 00/00/0000 | 0             |                    |    |    |     | 0   | 0  |
| 5. | 00/00/0000 | 0             |                    |    |    |     | 0   | 0  |
| 6. | 00/00/0000 | 0             |                    |    |    |     | 0   | 0  |
| 7. | 00/00/0000 | 0             |                    |    |    |     | 0   | 0  |

\*Nota: Debe rellenar la fecha y día de ciclo siguientes a la última fecha de tratamiento

Fechaestrad1:  00/00/0000 Estradio1:  Foliculo > 12:  Dosis total FSH:

Fechaestrad2:  00/00/0000 Estradio2:  Foliculo > 14:  Foliculo > 17:  Dosis total LH:

P4:  Fecha P4:  00/00/0000 Doctor P:

Descripción Punción:

HCG:  00/00/0000 Punción:  00/00/0000

Fecha de Transferencia  00/00/0000 Doctor TE:

Descripción TE:

Test Gestación Evolutiva:

Evol.Emb.

Evolución de Ciclo FIV:

**DATOS DE LABORATORIO**

Nº de óvulos:  (Nº de óvulos vitrif):  (Fecha de vitrif óvulos):  00/00/0000 (Nº óvulos ICS):  (Nº óvulos FIV)

Nº total de fecundados:  Nº total de embriones:  (Nº Embriones T)  (Calidad embriones T)

(Día TE)2-3-5:  (Nº de embriones cong):  (Día cong):  (Fecha CONG):  00/00/0000

Observaciones:

Muestra de marido

Tipo:  [ ] SPZ Totales (M/ml):  [ ] SPZ tipo a (M/ml):  [ ] SPZ tipo a+b (M/ml):

**Anexo IV. Formulario de pruebas de laboratorio clínico: Seminograma  
(software S.I.G.L.O)**

|                  |             |                 |                       |           |          |
|------------------|-------------|-----------------|-----------------------|-----------|----------|
| Número           | Fecha       | NHC             | Origen                | Doctor    | Servicio |
|                  |             |                 | HOSPITAL COSTA DEL SO |           |          |
| Nombre           | Sexo        | Edad            | Ambito                | Prioridad |          |
|                  | Hombre      |                 |                       |           |          |
| Motivo solicitud | Diagnóstico | Perfiles        |                       |           |          |
|                  |             | ESPERMIO CULSEM |                       |           |          |

| Prueba            | Resultado | Detalle         |
|-------------------|-----------|-----------------|
| <b>Andrología</b> |           |                 |
| VOLSP             |           | (1.5 - 5) ml    |
| FRESCO            |           |                 |
| LICSP             |           |                 |
| PHESP             |           | (7.2 - 8)       |
| RECSP             |           | (15 - 250) M/ml |
| SPZA              |           | M/ml            |
| SPZB              |           | M/ml            |
| SPZC              |           | M/ml            |
| SPZD              |           |                 |
| ESPPR             |           | M/mL            |
| ESPPR%            |           | (32 - 100) %    |
| ESPMO%            |           | (40 - 100) %    |
| MORFOL            |           | (4 - 100) %     |
| EOSINA            |           | (58 - 100) %    |
| DIAG              |           |                 |

**Anexo V. Formulario de datos de laboratorio de tratamiento de F.I.V. (software Lotus).**

Approach - [LABFIV2.APR:1º CICLO FIV]

Archivo Edición Ver Crear Registro Ventana ?

M. registro M. diseño Nuevo reg. Buscar Todos los registros

1º CICLO FIV \ Andrología \ Informe 1 \ RESUMEN CICLOS \ DATOS TOTALES \ Hoja 2 \ Hoja 3 \ Hoja 4 \

**CICLO FIV LABORATORIO FIV**

NH | NOMBRE | indicacion | EDAD MUJER **D.**

|                                 |                  |                 |                   |                      |
|---------------------------------|------------------|-----------------|-------------------|----------------------|
| <b>dia+0</b>                    | <b>Dia+1</b>     | <b>transfer</b> | comenttransfer    | Embriocultilargo     |
| nºlab                           | NºfecundadosICSI | diatransfer     |                   | Embriocongel         |
| Nºciclo                         | NºfecundadosFIV  | Nºembriototal   | comentcongel      | NºPajuelas           |
| Nºovulospuncion                 | Nº3PN            | Nºtransferidos  |                   | Calidadembrioncongel |
| MI                              | Nº1PN            | A               |                   |                      |
| MI                              | Lis ICSI         | B               |                   |                      |
| VG                              | comentdia+1      | C               |                   |                      |
| lisado No clasif.               |                  | D               |                   |                      |
| NºovulosICSI                    |                  | Mnb             |                   |                      |
| NºovulosFIV                     |                  | Bnb             |                   |                      |
| Nº ovulos vitrificados          |                  | Bloq            |                   | CalidadembrionI      |
| MI vitrif MI I vitrif VG vitrif |                  |                 |                   | CalidadembrionII     |
| comentdia+0                     |                  |                 | CalidadembrionIII |                      |

Approach - [LABFIV2.APR:Andrologia]

Archivo Edición Ver Crear Registro Ventana ?

M. registro M. diseño Nuevo reg. Buscar Todos los registros

1º CICLO FIV \ Andrología \ Informe 1 \ RESUMEN CICLOS \ DATOS TOTALES \ Hoja 2 \ Hoja 3 \ Hoja 4 \

**FIV-ANDROLOGIA**

NOMBRE

semenfiv

VOL Licuef

|                 |                    |                    |
|-----------------|--------------------|--------------------|
| nºtotfiv/ml     | biopstestefecha1   | biopstestefecha2   |
| nºtotfiv_A/ml   | biopstestedescrip1 | biopstestedescrip2 |
| nºtotfiv_A+B/ml |                    |                    |
| nºcapfiv/ml     | nºmuestras1        | nºmuestras2        |
| nºcap_A/ml      | nºpaj1             | nºpaj2             |
| nºcapfiv_A+B/ml |                    |                    |

## Anexo VI. Formulario recogida de datos del estudio.

Microsoft Excel - Libro1

Esta copia de Office no es original. Haga clic aquí para obtener más información en línea.

Archivo Edición Ver Insertar Formato Herramientas Datos Ventana 2

Escriba una pregunta

Jr a Office Live Abrir Guardar

I13

|    | A          | B        | C                     | D     | E                  | F    | G         | H      | I     | J         | K           | L          | M                 | N    | O     | P  | Q       | R                          | S          | T          | U        | V             | W                   | X              | Y           | Z               | AA            | AB     | AC         | AD           |
|----|------------|----------|-----------------------|-------|--------------------|------|-----------|--------|-------|-----------|-------------|------------|-------------------|------|-------|----|---------|----------------------------|------------|------------|----------|---------------|---------------------|----------------|-------------|-----------------|---------------|--------|------------|--------------|
| 1  |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 2  | CLU        |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 3  |            |          | DATOS TRATAMIENTO FIV |       |                    |      |           |        |       |           |             |            | DATOS SEMINOGRAMA |      |       |    |         | ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICA |            |            |          |               | ESTUDIO POR qRT-PCR |                |             |                 |               |        |            |              |
| 4  | Fecha cong | Apertura | Nº                    | Causa | Ediag <sup>+</sup> | Edad | fact term | kénica | % fgc | Nº emb TE | Calidad Emb | Test gresh | CI                | Ce+b | % a+b | Cc | % a+b+c | M                          | no tinción | SI tinción | Acrosoma | Acros+PI/Cola | Total Acos          | Cabeza+PI/cola | PI y/o cola | Tinte Parciales | Total tinción | Nº PCR | detect PCR | Potencia PCR |
| 5  |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 6  |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 7  |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 8  |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 9  |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 10 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 11 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 12 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 13 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 14 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 15 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 16 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 17 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 18 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 19 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 20 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 21 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 22 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 23 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 24 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 25 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 26 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 27 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |
| 28 |            |          |                       |       |                    |      |           |        |       |           |             |            |                   |      |       |    |         |                            |            |            |          |               |                     |                |             |                 |               |        |            |              |

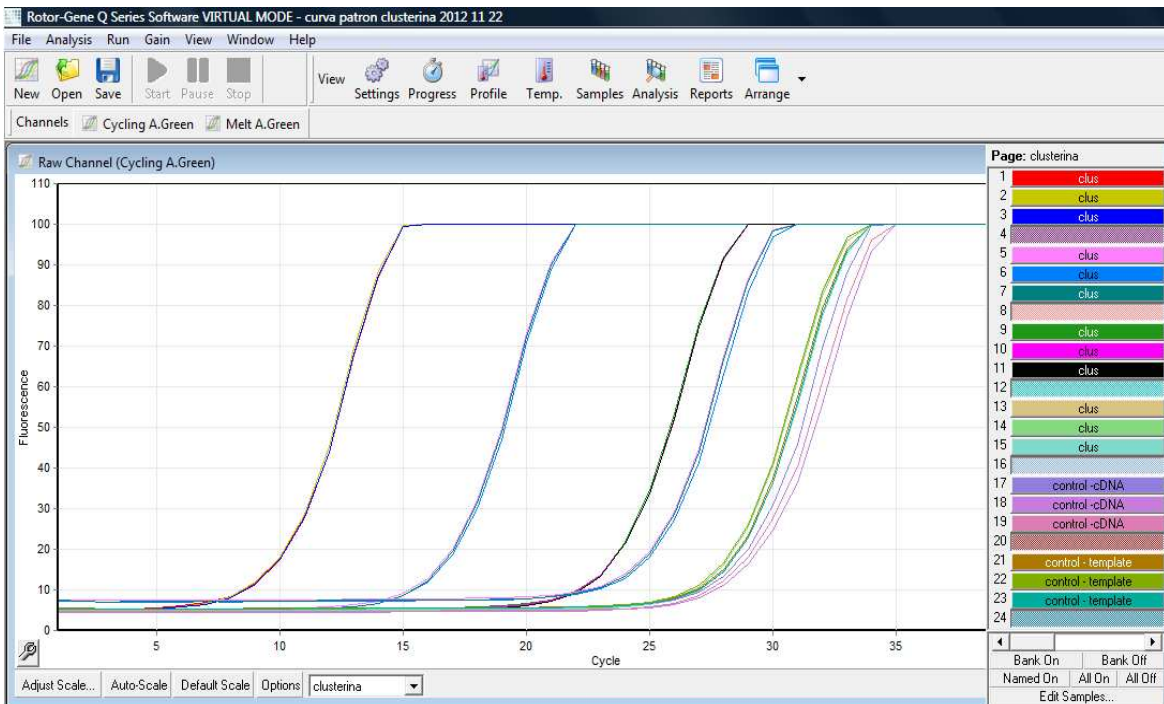
Hoja1 / Hoja2 / Hoja3

Dibujo Autoformas

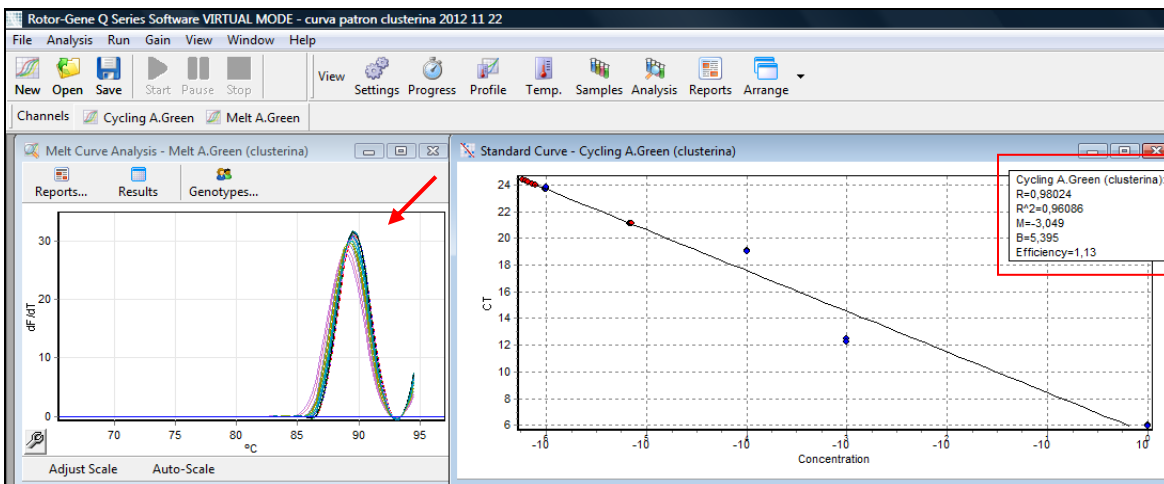
Leto

## Anexo VII. Curvas patrón.

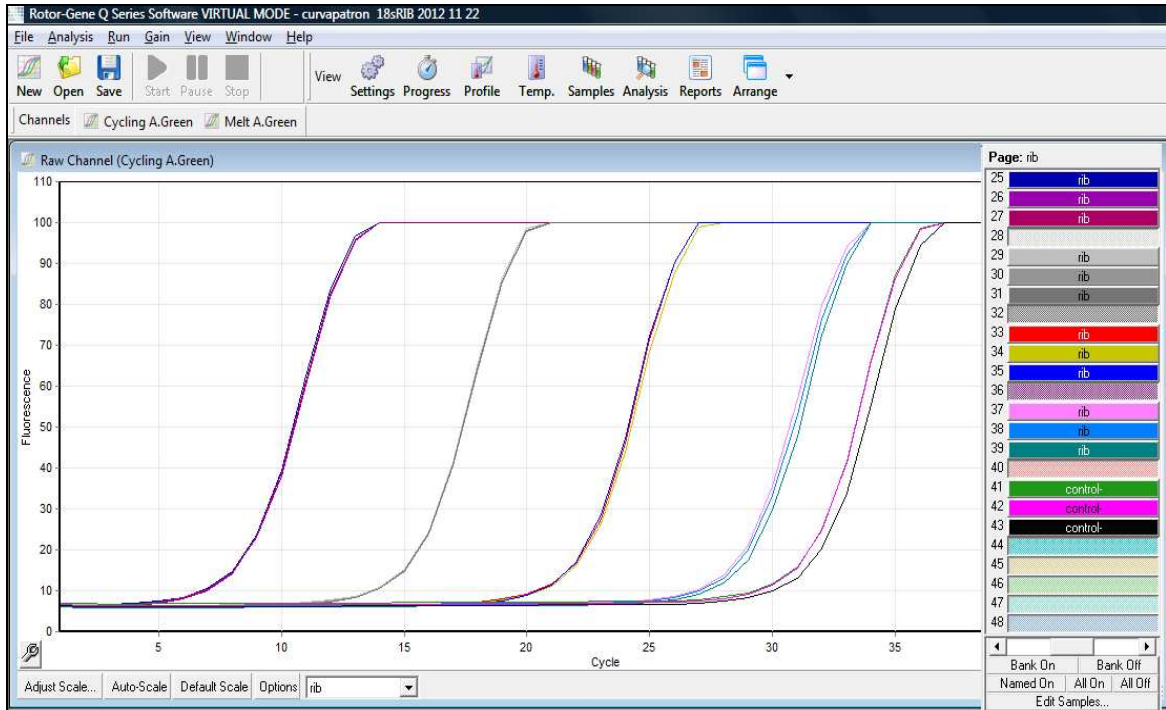
### A. Curva patrón para clusterina.



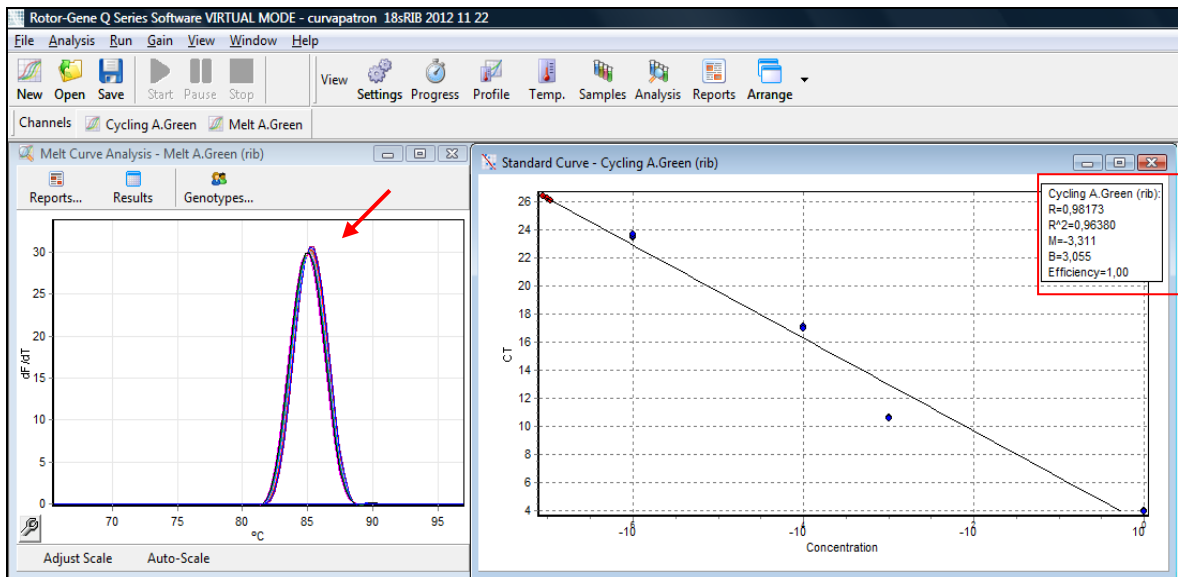
### Curva melting



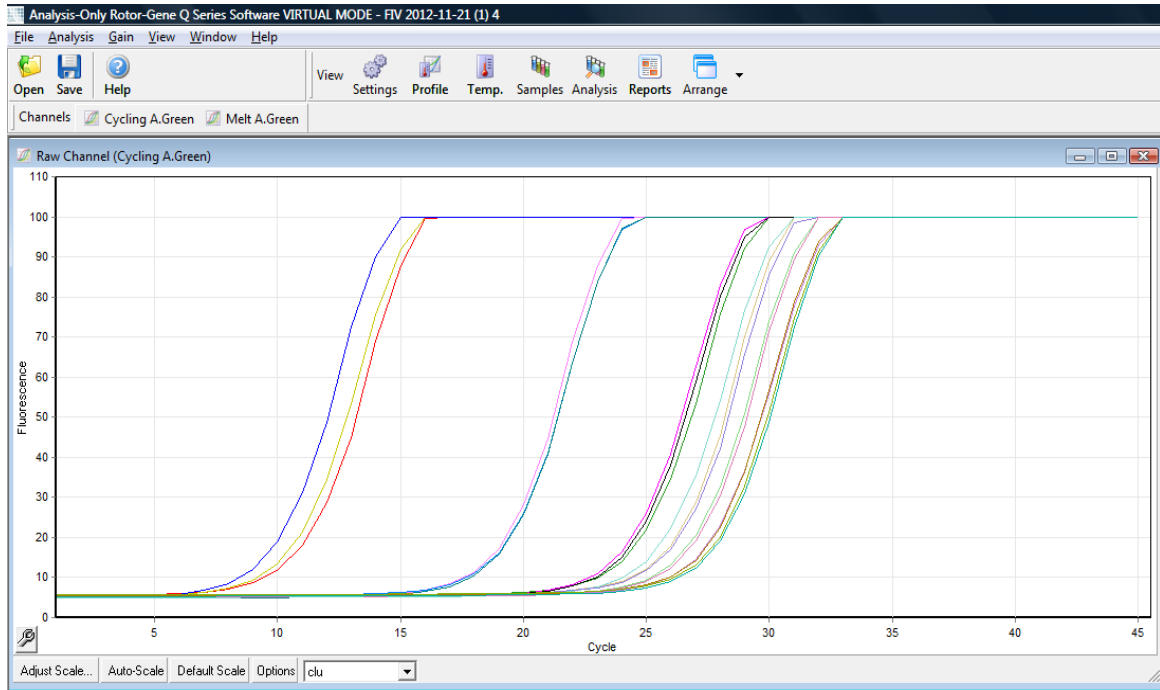
## B. Curva patrón para 18S ribosómico.



## Curva melting



### C. Curva patrón para GADPH.



### Curva melting

