



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE
BIOTINA SOBRE LA MOTILIDAD DEL
ESPERMATOZOIDE DE RATÓN DURANTE EL PROCESO
DE CAPACITACIÓN *IN VITRO*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SANDRA DELFÍN AZUARA

TUTORA

DRA. KARINA PASTÉN HIDALGO



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Cristina Fernández Mejía le agradezco por todas sus enseñanzas, tanto en lo académico como en lo humano, por sus palabras de aliento y por su paciencia infinita. Usted es alguien a quien admiro, respeto y quiero mucho. Muchas gracias doctora por haber creído en mí en todos aquellos momentos en que yo no lo hacía, me cambió la vida.

Dra. Karina Pastén Hidalgo, fui muy afortunada de que haya sido mi tutora, no sólo es una mujer muy inteligente y excelente científica pero sobre todo, es una gran amiga. Gracias por siempre enseñarme que ser humildes y compartidos nos lleva a ser mejores personas y por todas las risas que compartimos. Siempre llevaré sus enseñanzas en mi corazón.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio por su cariño y amistad. Dra. Leticia Riverón, LN Esmeralda Enríquez, Biol. Sofía Enciso , M en C. Gloria Sicilia, M. en C. Xadeni Burgos, Paulina Morales, M. en C. Alain de Jesús Hernández, M. en C. Aaron Rodríguez y Biol. Armando Elizalde, pasé días muy lindos a su lado.

Agradezco al Dr. Miguel Tapia Rodríguez de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por el apoyo en la toma de las fotografías presentadas en este trabajo.

DEDICATORIA

A mi mamá, Guadalupe Azuara Franco, por todo tu amor y apoyo infinitos. Gracias por impulsarme a ser una mujer fuerte, independiente y crítica. Gracias por siempre estar a mi lado y nunca cansarte de demostrarme cuánto me amas con todos esos detalles tan lindos que llevo en mi corazón. Te amo.

A mi papá, Francisco Delfín Lara, por cuidarme, amarme y apoyarme en cada momento de mi vida. Gracias por nutrir mi amor por la naturaleza, enseñarme a ser valiente, siempre invitarme a ser la mejor versión de mi misma y por darme el mejor ejemplo de lo que significa ser humano. Te amo.

A mi hermana, Samantha Delfín Azuara, por todas las veces que jugamos a ser científicas y por siempre enseñarme cosas nuevas. Siempre he admirado tu gran inteligencia y me encanta que compartas mi amor por la ciencia. Te amo mi robocop.

A mon petit-ami, Julien Pecoud-Bouvet, merci pour ton soutien et ton amour. Merci aussi de m'avoir poussée à être meilleure chaque jour. Cette aventure a été rendue plus douce à tes côtés.

ÍNDICE

1. Resumen	5
2. Introducción	6
2.1 Biotina	6
2.2 Aparato reproductor masculino en mamíferos	10
2.3 Espermatogénesis	10
2.4 Morfología del espermatozoide	13
2.5 Maduración epididimal	16
2.6 Capacitación	17
2.7 Reacción acrosomal	21
2.8 Fertilización	25
2.9 Fertilización asistida	26
3. Antecedentes directos del proyecto	28
4. Hipótesis	29
5. Objetivo general	29
5.1 Objetivos particulares	29
6. Materiales y métodos	29
6.1 Reactivos	29
6.2 Animales	30
6.3 Obtención y cuantificación de espermatozoides	30
6.4 Capacitación de espermatozoides y tratamiento con biotina	31
6.5 Electroforesis e inmunoblot de proteínas	32
6.6 Fijación de células	32
6.7 Ensayo de inmunofluorescencia	33
6.8 Estimación de la reacción acrosomal y daño morfológico	33
6.9 Evaluación de la movilidad de los espermatozoides	34

6.10 Estadística	34
7. Resultados	35
7.1 Efecto de la adición de biotina al medio capacitante sobre la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina	35
7.2 Efecto de la biotina sobre el flagelo y la cabeza del espermatozoide	38
7.3 Efecto de la biotina sobre la reacción acrosomal	42
7.4 Efecto de la biotina sobre la motilidad espermática	43
8. Discusión	47
9. Conclusiones	50
10. Perspectivas	50
11. Anexos	51
12. Bibliografía	55

1. RESUMEN

En la actualidad, aproximadamente el 15% de las parejas en el mundo presentan dificultades para lograr un embarazo (Agarwal, 2015), es por esto que se han desarrollado una serie de procedimientos que en conjunto se denominan técnicas de fertilización asistida. La fertilización *in vitro* es uno de los procedimientos más empleados dentro de estas prácticas y su objetivo es lograr la fusión de los gametos fuera del cuerpo humano sin que ninguno de estos o el embrión se vean comprometidos. Para lograr una fertilización exitosa, deberán llevarse a cabo eventos previos a la misma en un orden específico: capacitación, reacción acrosomal y singamia. La capacitación consiste en una serie de cambios bioquímicos que le permiten al espermatozoide aproximarse al óvulo e interactuar con él a nivel bioquímico. La motilidad hiperactivada, así como la fosforilación de proteínas son evidencia que este proceso ha ocurrido. La reacción acrosomal consiste en una exocitosis de las enzimas contenidas en la vesícula acrosomal, esto le permite al espermatozoide entrar en contacto directo con el oolema y fusionarse con el óvulo.

Los espermatozoides de individuos subfértiles presentan alteraciones que comprometen su capacidad de fosforilar proteínas en residuos de tirosina y por lo tanto su motilidad, es por esto, que se busca algún agente capaz de activar a los espermatozoides para lograr la fertilización *in vitro*. Una propuesta reciente es la biotina (Kalthur et al. 2012), pues es una vitamina que no se considera tóxica y se ha demostrado que aumenta la motilidad de los espermatozoides humanos *in vitro* a una concentración de 10 nM.

En el presente trabajo se analizó el efecto de la incubación con diferentes concentraciones de biotina durante 30, 60 y 120 minutos, sobre espermatozoides de ratones BALB/c de entre 8 y 11 semanas de edad, capacitados *in vitro*.

Los resultados mostraron que transcurridas dos horas de incubación con biotina a una dosis 10 nM aumenta la fosforilación de proteínas (Mr 40,000-120,000) (Visconti et al., 1995) en residuos de tirosina respecto a los espermatozoides capacitados en ausencia de esta vitamina. Sin embargo, a una dosis de 100 nM se observó disminución de la fosforilación, afectando por lo tanto, el proceso de capacitación. Respecto a la morfología del espermatozoide, la biotina aumentó la incidencia de daños en cabeza y flagelo a medida que transcurrió el tiempo y aumentó la dosis. Finalmente se observó que la biotina aumenta la reacción acrosomal temprana para ambas dosis.

Estos resultados, aunados a observaciones previas del efecto de concentraciones farmacológicas de biotina sobre la estructura tisular, modifican el concepto de la inocuidad toxicológica de la biotina y hace esencial el estudio a profundidad de esta vitamina, en particular en técnicas que tienen como fin el desarrollo de un nuevo organismo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 BIOTINA

La biotina es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B (vitamina B7 o vitamina H), los mamíferos son incapaces de producirla, por lo que la adquieren a través de la dieta y en menor medida es sintetizada por bacterias presentes en el intestino. Fuentes importantes de biotina son los vegetales, la leche, la yema de huevo y el hígado (De la Vega Monroy, 2012). A concentraciones fisiológicas su función clásica es la de participar como grupo prostético de las enzimas carboxilasas acetil-CoA carboxilasas 1 y 2 (ACC1 y ACC2), piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC). Todas, a excepción de ACC1 que se sitúa en el citosol, se encuentran localizadas en la mitocondria. La biotina se une covalentemente con las enzimas carboxilasas y transfiere un grupo carboxilo a un sustrato específico. Las holocarboxilasas participan en diferentes rutas metabólicas tales como la gluconeogénesis, lipogénesis y la degradación de aminoácidos (Vilches-Flores y Fernández-Mejía, 2005).

La biotina se encuentra generalmente en forma de biocitina, i.e. unida de manera covalente a residuos de lisina de algunas proteínas, y en menor proporción de forma libre. Las proteasas y peptidasas que se encuentran en el sistema digestivo liberan biocitina a partir de la degradación de proteínas que se ingieren en la dieta, y posteriormente la enzima biotinidasa (BTD) hidroliza la molécula de biocitina, dejando a la biotina en su forma libre. La absorción de esta vitamina ocurre en las células intestinales primero en la membrana apical a través de la proteína transmembranal denominada transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT) en donde se lleva a cabo un transporte dependiente de sodio y electroneutro. Le sigue un transporte no dependiente

de sodio que obedece a un gradiente de concentración en la membrana basal de las mismas células donde la biotina se liberará al torrente sanguíneo.

La biotina ingresa a las células a través del SMVT y se distribuye principalmente en las mitocondrias y el citoplasma. Las enzimas carboxilasas que se encuentran inactivas se denominan apocarboxilasas. La forma activa, holocarboxilasa, se formará al unir una molécula de biotina de manera covalente a la apocarboxilasa en un residuo de lisina específico localizado en una región altamente conservada en estas enzimas (Zempleni et al, 2009). Dicha unión está mediada por la holocarboxilasa sintetasa (HCS) y requiere de la hidrólisis de ATP (Zempleni et al. 2009). La biotina auxilia a estas enzimas a transferir bicarbonato en forma de un grupo carboxilo a un sustrato específico. Al término de esta reacción mediada por la holocarboxilasa, la enzima biotinidasa liberará a la biotina en forma de biocitina, finalmente de esta última puede removerse el excedente de lisina dejando libre a la biotina para reutilizarse. Lo anterior se encuentra mediado por la enzima biotinidasa (BTD) y se conoce como el ciclo de la biotina (Vilches-Flores y Fernández-Mejía, 2005). En caso de que la biotina no se reutilice, será catalizada formando biotin sulfóxido o bisnorbiotina que se excretarán a través de la orina (Lazo de la Vega Monroy, 2012).

La ingesta recomendada diaria de biotina para un ser humano adulto es de 30 µg diarios (Yates et al., 1998). La deficiencia de esta vitamina puede estar relacionada con un alto consumo de clara de huevo cruda que contiene una alta cantidad de la proteína avidina que es capaz de unir covalentemente a la biotina e impedir su absorción a nivel del intestino delgado. Una baja actividad de la enzima biotinidasa es otra causa de deficiencia, pues lo anterior provoca una ineficiencia del sistema de reutilización de la vitamina, consecuentemente la biotina se mantiene en forma de biocitina que se excreta a través de la orina. Finalmente, una situación de desnutrición crónica podría ser también la causante de bajos niveles de biotina. Aunque es poco común esta condición, la deficiencia de esta vitamina tiene como consecuencia diferentes condiciones tales como: conjuntivitis, alopecia, infecciones de la piel, dolor muscular, y dermatitis perioral (Mock, 1991). Durante el desarrollo embrionario, en animales no humanos, se ha demostrado que la deficiencia de biotina tiene consecuencias teratogénicas, entre otras (Zempleni y Mock, 2000).

En la actualidad existen diversos suplementos vitamínicos que contienen dosis suprafisiológicas de biotina y que son empleados para propósitos que van desde lo

estético (una mejora en la apariencia de cabello y uñas) hasta posibles beneficios metabólicos tales como una disminución de la hiperglucemia en pacientes diabéticos. Estos suplementos tienen concentraciones de biotina que van desde 40 hasta 166 veces la dosis diaria recomendada (Lazo de la Vega, 2012). A pesar de no haberse determinado aún la ingesta máxima tolerable, se considera que la biotina no es tóxica debido a su naturaleza hidrosoluble y de fácil eliminación a través de la orina, por lo que existen productos de venta libre adicionados con esta vitamina.

A concentraciones farmacológicas, i.e. 30 a 650 veces su requerimiento diario, se ha comprobado que la biotina modifica genes a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional. El mecanismo a través del cual se producen algunos de los efectos de concentraciones farmacológicas de biotina se ha asociado al aumento de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) (Vilches-Flores et al, 2010), sin embargo otros estudios han propuesto a la biotilación de las histonas como el efector de las acciones de la biotina (Zempleni et al., 2008).

Se ha reportado que la biotina es capaz de modificar procesos metabólicos. De manera benéfica, la suplementación con biotina es capaz de mejorar la respuesta endócrina del páncreas a la glucosa incrementando la secreción de insulina, mejorar la tolerancia a la glucosa (Lazo de la Vega, 2012) así como la sensibilidad a la insulina y por lo tanto reducir la hiperglucemia en pacientes con diabetes tipo 1 y 2 (Coggeshall et al., 1985). También se ha reportado un efecto positivo en pacientes con dislipidemias, pues se observó una disminución de colesterol y de triglicéridos en sangre en pacientes con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia respectivamente (Revilla-Monsalve et al., 2006). Así mismo se reportó en ratas hipertensas que la administración de biotina en el agua (aproximadamente 1.2 mg/kg de peso) durante ocho semanas, tuvo un efecto antihipertensivo (Watanabe-Kamiyama et al., 2008). Cabe destacar que la suplementación con biotina es capaz de modificar el estado de fosforilación de algunas proteínas (Aguilera-Méndez y Fernández-Mejía, 2012, Boone-Villa y Fernández-Mejía, 2015).

Con respecto a procesos involucrados con la reproducción se han reportado diversos efectos positivos sobre la suplementación de biotina. Un estudio con hembras porcinas mostró un aumento de la reproducción de estos animales debido a que la vitamina adelantó la fase de estro en el ciclo de las hembras dejándolas receptivas a los machos y consecuentemente aumentando el número de embarazos en una menor cantidad de

tiempo (Simmins y Brooks, 1983). Sin embargo, existe controversia puesto que estudios similares arrojaron datos que no indican el mismo efecto (Lewis et al., 1991). Otro estudio en vacas demostró que la suplementación con biotina aumentó los niveles de producción de leche sin modificar de manera significativa la proporción de proteína y grasa (Majee et al., 2003). En gallinas, agua suplementada con esta vitamina aumentó la producción de huevos y la tasa de fertilidad sin modificar la incubabilidad o la calidad de la misma (Daryabari et al., 2014).

Contrariamente, otra serie de estudios arrojaron efectos no favorables respecto a procesos reproductivos. Por ejemplo, en invertebrados, específicamente en especies específicas de moscas, mosquitos y escarabajos, la biotina disminuyó la fertilidad de las hembras (Cohen et al, 1968; Benschoter et al., 1967; Pillai y Medhukar, 1969). En ratones la suplementación con biotina disminuyó el número de folículos primarios y de Graaf (Báez-Saldaña et al., 2009). En vacas suprimió la ovulación, así como los signos del estro (Kinal et al., 2011). Respecto al desarrollo embrionario, la suplementación con biotina afectó la estructura de la retina y del lente ocular en embriones de pollo (Valenciano et al., 2002).

Los efectos de la suplementación con biotina sobre el aparato reproductor masculino no están ampliamente estudiados. En un trabajo reciente (Pastén-Hidalgo et al., 2019) al término de ocho semanas de ingerir una dieta suplementada con biotina (97.7 mg/kg de peso) se analizó el tejido testicular de ratones de la cepa BALB/c. En el grupo suplementado se observó hiperplasia de las células de Leydig, aumento del espacio intratubular, incremento en el número de túbulos seminíferos con una forma alargada (pérdida de la circularidad), así como en túbulos seminíferos con lumen cerrado. Respecto al epitelio seminífero, se apreció una desorganización celular en donde se observaron un aumento en el número de capas de las células espermatogénicas sin que se apreciara un incremento en el número de espermatozoides. Lo anterior sugiere una alteración en el equilibrio proliferación/apoptosis de las espermatogonias, así como un retraso en el proceso de espermatogénesis. Finalmente, las alteraciones en los túbulos seminíferos culminaron en el desarrollo de espermatozoides con defectos morfológicos que a su vez provocaron daños en la motilidad (Pastén-Hidalgo et al., 2019).

2.2 APARATO REPRODUCTOR MASCULINO EN MAMÍFEROS

Los túbulos seminíferos se encuentran dentro de los lobulillos testiculares que se forman a partir de los septos testiculares y están rodeados por una membrana basal y revestidos en su interior por una cubierta celular denominada epitelio seminífero. Este último comienza a desarrollarse a partir de la pubertad y es un epitelio grueso que contiene dos tipos principales de células:

- Células de Sertoli: sostienen a las células germinales y participan directamente en su nutrición.
- Células espermatogénicas: proliferan y se diferencian en espermatozoides.

Las células de Sertoli son también llamadas células de sostén o sustentaculares. Se caracterizan por tener forma piramidal, citoplasma abundante y un núcleo ovalado. Estas células se extienden desde la membrana basal hasta la luz del túbulo seminífero uniéndose entre sí para formar una estructura denominada barrera hematotesticular que divide al tubo en dos regiones bien definidas: el compartimento basal y el compartimento adluminal. El primero se encuentra entre la pared del túbulo seminífero y la superficie interna de las uniones de las células de Sertoli, es esta la región donde se encuentran resguardadas las espermatogonias. En este compartimento también se encuentran grandes cantidades de hormonas esteroideas, iones y aminoácidos. El compartimento adluminal comprende la región a partir de la superficie externa de las uniones entre células de Sertoli hasta la luz del túbulo seminífero y es una sección bien protegida y aislada para evitar cualquier daño a los espermatozoides que ya se han formado a causa de una sustancia tóxica o incluso del sistema inmunológico del mismo organismo (figura 1).

2.3 ESPERMATOGÉNESIS

El espermatozoide es una célula pequeña respecto al resto de las células somáticas. Durante su desarrollo pierde casi todo el citoplasma, varios organelos y la capacidad de sintetizar proteínas, resultando en una célula altamente compartimentalizada, capaz de

moverse, así como de sobrevivir y funcionar fuera del aparato reproductor masculino (Urner y Sakkas, 2003).

Los espermatozoides se forman dentro de las gónadas masculinas: los testículos, específicamente dentro de los túbulos seminíferos que constituyen hasta el 95% del tejido testicular. En el ser humano este proceso toma un tiempo estimado de 65 días y se encuentra regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. El hipotálamo secreta hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que a su vez estimula a la hipófisis a secretar hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). A esta última se le atribuye la capacidad de generar la producción de testosterona en el estroma de los testículos que envía la señal para el inicio de la producción espermática (Rev. en Sutovsky et Gaurishankar, 2006).

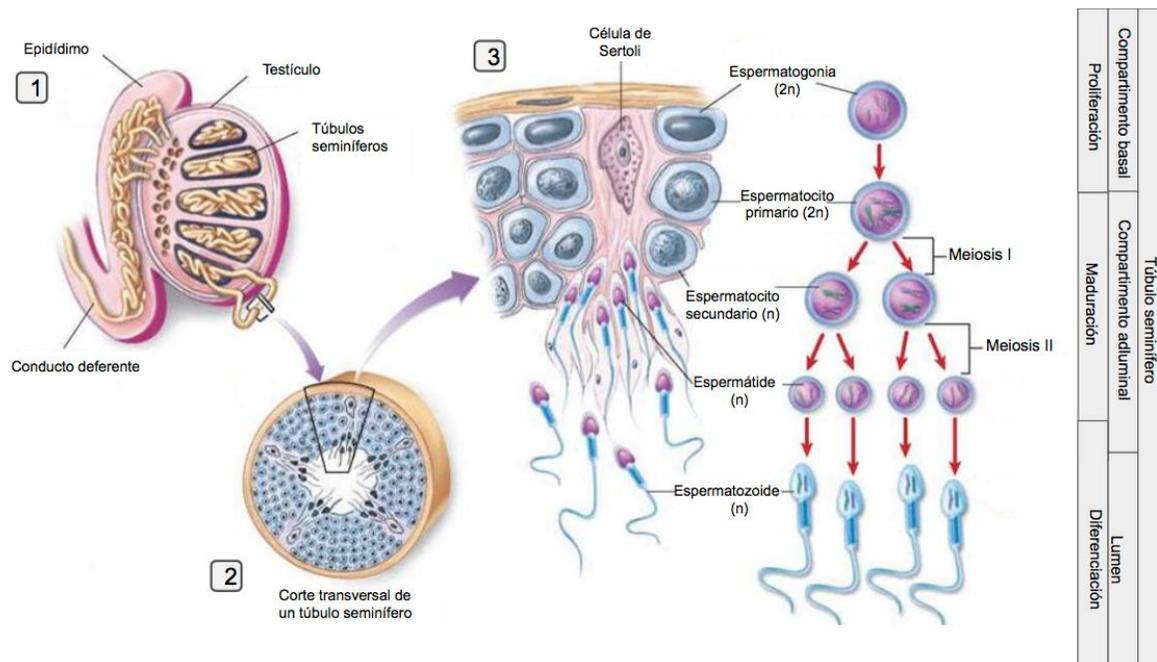


Fig. 1 Espermatogénesis. 1. Corte transversal de testículo, se observan los túbulos seminíferos dentro de la gónada. 2. Corte transversal de un túbulo seminífero. 3. Etapas de la espermatogénesis y sitios del epitelio seminífero donde se llevan a cabo. Modificado de:

[<https://www.philpoteducation.com/mod/book/view.php?id=814&chapterid=1094#/>]

La espermatogénesis es el proceso por el cual se forman los espermatozoides y consiste en una maduración y diferenciación de las células espermatogénicas, también denominadas espermatogonias. Este proceso requiere de dos procesos simultáneos y

constantes: renovación de células espermatogénicas y diferenciación de estas. Se divide en tres etapas:

I) Proliferación. Durante esta etapa las espermatogonias se multiplican y crecen manteniendo constante la población de estas células a través de un proceso de mitosis. Este proceso se lleva a cabo en el compartimento basal del túbulo seminífero que es rico en nutrientes (Sutovsky y Gaurishankar, 2006).

II) Maduración. Durante esta fase algunas de las espermatogonias se dividen a través de meiosis, resultando en células haploides que se denominan espermátides. Esta fase ocurre en la región adluminal de los tubulillos seminíferos protegiendo a las células, que están diferenciándose, de la respuesta inmunológica del cuerpo (Sutovsky y Gaurishankar, 2006).

III) Diferenciación. Finalmente, durante esta etapa las espermátides atraviesan por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos (sin que se lleve a cabo una división celular) que les confiere potencial para atravesar el tracto genital femenino, así como fertilizar al óvulo. Pasarán de ser una célula haploide redondeada similar a las células somáticas a convertirse en una célula altamente diferenciada y especializada para llevar a cabo el proceso de fertilización. A su vez, esta última fase de la espermatogénesis puede dividirse en espermiogénesis y espermiación (Sutovsky y Gaurishankar, 2006).

Durante la espermiogénesis, la célula modifica varias estructuras, entre estos cambios se encuentran: a) formación del flagelo y cabeza; b) desarrollo del complejo acrosomal a partir del aparato de Golgi y la migración del mismo hacia la región apical de la célula; c) modificación del núcleo que adquiere una forma elíptica y toma una posición excéntrica; d) sustitución de histonas por protaminas que permiten una hipercondensación del material genético así como su protección al salir del cuerpo; e) eliminación de aproximadamente la mitad de las mitocondrias celulares y migración de las restantes hacia la región denominada pieza media; f) formación de un refuerzo membranal de las mitocondrias denominado cápsula mitocondrial. Cabe destacar que después de estos cambios la cromatina se mantiene en un estado en el que es incapaz de sintetizar ARN o ADN (i.e. la transcripción se encuentra silenciada) y se encuentra tan protegida que es resistente a la maduración epididimal, almacenamiento y algunos tipos de digestión enzimática (Hernández-Pérez y Ballesteros, 1998).

Por otro lado, durante la llamada espermiación se elimina una gran cantidad de citoplasma a manera de una estructura denominada cuerpo residual que será fagocitada por las células de Sertoli, sin embargo un pequeño residuo denominado gota citoplasmática queda adherido al cuello del espermatozoide e irá migrando hacia la región distal, a medida que el espermatozoide se desplaza a través del epidídimo, en la mayoría de los mamíferos la gota citoplasmática se eliminará al finalizar el tránsito del espermatozoide por esta estructura. Finalmente, el espermatozoide totalmente formado se separa del epitelio seminífero por completo así como de otros espermatozoides situándose en la luz del túbulo seminífero a partir de donde será transportado a la rete testis (Sutovsky y Gaurishankar, 2006).

La eliminación de varios organelos del espermatozoide y el reciclaje de materiales para la formación de nuevas estructuras dentro de esta célula depende directamente de la proteólisis dependiente de ubiquitina. Ejemplo de sustratos ubiquinados son las histonas H2A y H3 que serán sustituidas por protaminas (Sutovsky y Gaurishankar, 2006).

2.4 MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula móvil altamente especializada que es fácilmente diferenciable del resto de las células. Tiene un tamaño aproximado de 123 μm en ratones y 55 μm en humanos. Pueden diferenciarse tres regiones en su estructura:

l) Cabeza. Es la región apical de la célula. En el grupo de los roedores, la cabeza tiene forma de gancho (falciforme), mientras que en los humanos se aprecia una forma de espátula. En ratones mide aproximadamente 8 μm de largo por 3 μm de ancho. Contiene al núcleo celular y al acrosoma. El núcleo, que contiene y protege a la cromatina altamente condensada, se encuentra rodeado por una membrana denominada teca perinuclear que consiste en una cubierta rígida formada por diversas proteínas unidas a través de enlaces disulfuro (Sutovsky y Gaurishankar, 2006). El acrosoma es una estructura membranosa que se sitúa por encima del núcleo. Contiene una gran cantidad de enzimas capaces de degradar las capas que rodean al óvulo como hialuronidasa, proteasas, acrosina y tripsina (Georgadaki et al., 2016).

II) Pieza media o cuello. Mide aproximadamente 18 μm de largo en ratones. Tiene un denso capitel a partir del cual se extienden a manera de embudo nueve columnas gruesas que se continúan con las nueve fibras externas del flagelo y que se hacen más delgadas a medida que se extienden por la cola (López-García et al., 2012). En esta región se encuentran aproximadamente 75-100 mitocondrias dispuestas de manera helicoidal alrededor del flagelo, están encargadas de proveer energía para que la célula pueda sobrevivir y moverse (Sutovsky y Gaurishankar, 2006). A pesar de que la pieza media no es la única región de esta célula donde se produce energía, si aporta la mayor cantidad de energía gracias a que lleva a cabo fosforilación oxidativa (García-Vázquez et al., 2016).

III) Flagelo o pieza principal. Se encuentra separado de la pieza media por el anillo de Jensen. Con una longitud aproximada de 96 μm en ratones, esta estructura filiforme permite a la célula moverse. Se encuentra recubierto en la primera porción por una vaina fibrosa y posteriormente solamente por la membrana flagelar. Su estructura, partiendo del centro hacia la periferia, consiste en un axonema formado por dos microtúbulos centrales rodeados por otros nueve pares. Los componentes de cada par se denominan microtúbulos A y B. Se conoce como axonema 9+2 a este tipo de distribución (López-García, 2012). Los microtúbulos A poseen dos brazos de dineína en forma de gancho que abrazan a cada microtúbulo B, esta proteína es capaz de hidrolizar ATP y producir energía para impulsar al espermatozoide. Una cubierta de fibras densas externas, provenientes de la pieza media, rodean al axonema y a su vez estas están recubiertas por una vaina fibrosa que le brinda soporte al axonema. Esta última está compuesta por dos columnas que corren paralelas a las fibras densas externas número tres y ocho conectadas entre sí por uniones transversales a manera de costillas (Sutovsky y Gaurishankar, 2006). Hacia la parte terminal del flagelo el grosor disminuye y se aprecia un desarreglo de los microtúbulos del axonema, a esta última porción se le denomina pieza terminal. En esta región del espermatozoide hay producción de energía a través de glucólisis.

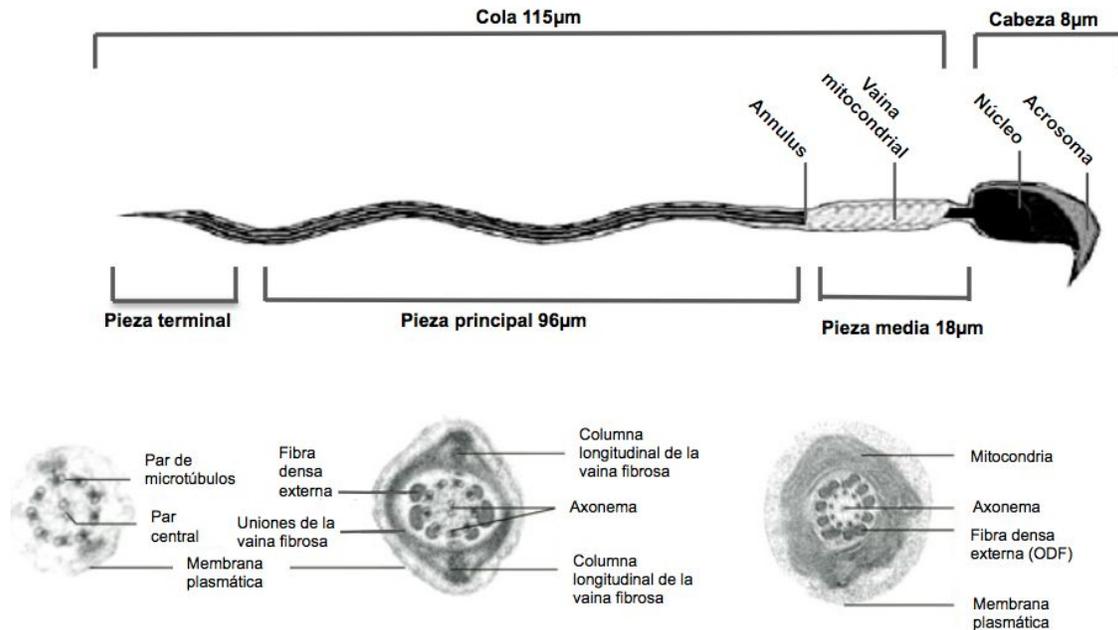


Fig. 2 Estructura del espermatozoide de ratón. El espermatozoide de ratones se caracteriza por tener una cabeza falciforme. Esta región contiene al acrosoma y al núcleo. La cola se divide en pieza media, pieza principal y pieza terminal. En la pieza media se distribuyen las mitocondrias que producen la energía necesaria para que la célula pueda desplazarse. La pieza principal presenta un filamento axial con un arreglo de 9+2 característico del flagelo eucariota. Modificado de:

[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Spermatozoa_Development]

Dentro de un eyaculado, existen varias subpoblaciones de espermatozoides que se clasifican según la morfología, tamaño, motilidad, sensibilidad a moléculas de señalización y grado de fragmentación del ADN. Muchos de los espermatozoides se encuentran en condiciones óptimas respecto a las características enlistadas anteriormente, sin embargo, no todos llegan al oviducto ni se adhieren a su epitelio. El concepto de pasaporte espermático sugiere que los procesos de selección que ocurren dentro del tracto genital femenino favorecen a los espermatozoides con las mejores características, que se mueven más rápido y no están capacitados. Un grado alto de motilidad supone una ventaja para los espermatozoides ya que se desplazarán más rápido dejando al resto de la población detrás (García-Velazquéz et al., 2016). Alteraciones en la morfología comprometen el potencial de fertilidad del espermatozoide.

2.5 MADURACIÓN EPIDIDIMAL

El epidídimo en mamíferos es una estructura que funciona a manera de almacén donde los espermatozoides maduran, adquieren capacidad para fertilizar y finalmente pierden la gota citoplasmática. En el grupo de los roedores se encuentran bien diferenciadas la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, contrario a lo que ocurre en humanos donde estas regiones no se encuentran bien definidas. Los cambios que se llevan a cabo dentro del epidídimo están poco estudiados para casi todos los grupos de mamíferos, sin embargo diferentes estudios en varios grupos nos permiten englobar una idea general de los cambios que atraviesan los espermatozoides al migrar por esta estructura.

Una vez desprendidos del epitelio seminífero, los espermatozoides son movilizados desde la rete testis, a través de los conductos eferentes hasta la cabeza del epidídimo. Estas células son maduras morfológicamente, pero incapaces de moverse aún, por lo tanto su desplazamiento está facilitado por varios factores, entre ellos la producción de más espermatozoides en los testículos, la secreción de fluidos por parte de las células de Sertoli y el epitelio de la rete testis, así como el movimiento de cilios que recubren las paredes de los conductos eferentes (Sutovsky y Manandhar, 2006). El tiempo de tránsito a través del epidídimo varía entre tres y 21 días dependiendo de la viscosidad del fluido epididimal y la especie del organismo.

Durante el tránsito por el epidídimo los espermatozoides desarrollan resistencia a presiones del medio exterior a través del incremento en el número de enlaces disulfuro intramolecular, acabado su recorrido podrán soportar cambios en la osmolaridad del fluido en el que se encuentren, e incluso no perderán fácilmente su estructura al exponerse al aire (Cooper, 2007). En este trayecto se integrarán a la membrana del gameto diferentes moléculas denominadas factores decapacitantes (DF's) que evitarán que la célula experimente una capacitación temprana. Es importante destacar que durante este tiempo de maduración el espermatozoide adquiere la capacidad de fosforilar algunas de sus proteínas que serán clave para que se lleven a cabo de forma efectiva los pasos previos a la fertilización así como la misma singamia (Gervasi y Visconti, 2017), lo anterior se sabe

porque espermatozoides extraídos de la región de la cabeza del epidídimo no fosforilan estas proteínas en residuos de tirosina a pesar de incubarse en condiciones óptimas, sólo lo lograrán aquellos obtenidos de la región caudal es decir, aquellos que hayan concluido su viaje a través del epidídimo (Visconti y Kopf, 1998).

Los espermatozoides adquieren una ligera movilidad conforme atraviesan el epidídimo. Al tomarse muestras de la región de la cabeza epididimal, los espermatozoides son totalmente inmóviles, y a pesar de que se les brinde los elementos necesarios para que desarrollen la capacidad de fertilizar al óvulo, no lo hacen. A medida que las muestras se obtienen de regiones próximas a la cauda los espermatozoides comienzan a mostrar ligeros movimientos. Se cree que esta movilidad es limitada debido al bajo pH encontrado en el fluido epididimal (Cooper y Ching-Hei, 2006).

2.6 CAPACITACIÓN

Los espermatozoides son expulsados por millones fuera del sistema reproductor masculino y depositados en el tracto genital femenino inmersos en líquido seminal. La vagina, cervix y útero representan los primeros filtros para espermatozoides anormales, las células del epitelio tienden a retener a aquellos espermatozoides que no presenten daños en la cromatina o daños morfológicos y las células blancas fagocitarán a aquellos que presenten algún tipo de alteración, especialmente en la pieza media o flagelo resultando en una motilidad afectada. Serán favorecidos los espermatozoides con motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, membrana íntegra y que tengan la capacidad de adquirir una motilidad hiperactivada (Hidalgo-Ordoñez, et al., 2005). Lo anterior apoya la idea que el tracto genital femenino selecciona los gametos masculinos con las mejores características. Una vez alcanzado el oviducto habrá una menor cantidad de células blancas y ocurrirá un cambio en la expresión génica de esta región del aparato reproductor femenino que brindará un ambiente menos hostil para los espermatozoides, regulando su funcionalidad y creando condiciones óptimas para la interacción de los gametos (García-Vázquez et al., 2016).

Los espermatozoides de los mamíferos placentarios no son capaces de interactuar con el óvulo ni fertilizarlo al ser exteriorizados del cuerpo del macho inmersos en el eyaculado.

Estos deberán salir del líquido seminal y ponerse en contacto directo con el moco cervical en el tracto genital femenino, en donde atravesarán una serie de cambios que los preparará para el momento de la fertilización (Ickowicz, 2012). A este proceso, que dura varias horas, se le denomina capacitación espermática, ocurre en un tiempo y región específicos y es imprescindible para que ocurra el reconocimiento y la fusión de los gametos.

La capacitación consiste en una serie de cambios de tipo bioquímico y fisiológico únicamente, es decir el espermatozoide no sufrirá modificaciones de tipo anatómico y se lleva a cabo exclusivamente en el oviducto. A continuación, se enlistan algunos de los cambios que ocurren durante este proceso:

I) Pérdida de factores decapacitantes en la superficie membranal que permiten una mayor entrada de Ca^{2+} a la célula (Reid et al., 2011).

II) Aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Incrementa de niveles basales de 100-150 nM hasta alcanzar un pico de 400-600 nM (Florman et al., 2008).

III) Pérdida de colesterol en la membrana celular que resulta en cambios en la fluidez e hiperpolarización de la misma de 30 a 60 mV (Visconti y Kopf, 1998), así como un aumento a la permeabilidad a iones de Ca^{2+} y HCO_3^- .

IV) Aumento del pH intracelular por el incremento de la concentración de bicarbonato. Esta molécula entra a la célula a través del transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, promoviendo la movilización de colesterol en la membrana plasmática y situándolo en regiones donde se encuentra disponible para aceptores de colesterol externos a la célula. El aumento de bicarbonato intracelular activa a la adenil ciclasa soluble, aumentando los niveles de cAMP que a su vez activa a proteínas cinasa (Ickowicz, 2012).

V) Formación de complejos de reconocimiento multiméricos (MZRC). Se lleva a cabo una migración de proteínas intracelulares a microdominios específicos en la superficie de la membrana plasmática que le permitirán al espermatozoide reconocer y unirse al ovocito, por ejemplo la proteína ZP3R involucrada en la reacción acrosomal. (Reid et al., 2011).

VI) Activación de escramblasas que resulta en un reacomodo de los fosfolípidos de la membrana plasmática, esto es esencial para que más adelante las membranas de los gametos puedan fusionarse (Reid et al., 2011).

VII) Cambios en la actividad de proteínas cinasas que resultan en un acoplamiento funcional de vías de transducción. Específicamente la activación de la proteína cinasa A (PKA) resulta en la fosforilación de proteínas en residuos de serina y treonina que a su vez promueven la fosforilación de otras proteínas en residuos de tirosina (Reid et al., 2011).

VIII) Cambios en la fosforilación de proteínas en un residuo de tirosina. Incluye proteínas, estructurales, metabólicas y canales iónicos ubicados únicamente en la pieza principal. Este evento ocurre en etapas tardías de la capacitación y es utilizado como evidencia que se ha llevado a cabo este proceso (Ickowicz, 2012).

IX) Activación o transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que conduce a la activación de fosfolipasa D (PLD) que resulta en la polimerización de actina G en cabeza y pieza principal. En la región de la cabeza se forman filamentos de actina F en el espacio comprendido entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal, esto evita una reacción acrosomal temprana. La polimerización de actina en la pieza principal permite la adecuada motilidad del espermatozoide y evita una reacción acrosomal temprana (Breitbart y Etkovitz, 2011).

X) Alteraciones en la motilidad flagelar. Activación de sistemas enzimáticos relacionados con la motilidad (adenil ciclasa, ATPasas y fosfolipasa A2 entre otras) (Reid et al., 2011).

Todos estos cambios resultan en una activación y modificación del movimiento del espermatozoide. Se reconocen dos tipos de eventos de señalización en la capacitación: rápidos y lentos. Ambos dependen de la activación PKA. Los eventos rápidos requieren de una activación rápida de PKA, ocurren a tiempos tempranos y están relacionados con la activación de un batido flagelar fuerte y asimétrico denominado movimiento progresivo. Por otro lado, los eventos lentos ocurren en las etapas finales de la capacitación, requieren que PKA se mantenga activa de una forma sostenida en el tiempo y se relacionan con el desarrollo del movimiento hiperactivado (Ickowicz, 2012). Éste es un patrón característico de movimiento que le permitirá al espermatozoide desplazarse hasta la región ampular de las trompas de Falopio e interactuar con el folículo ovárico, y le

brindará la fuerza que se requiere para penetrar la capa de las células de la granulosa y alcanzar la zona pelúcida para poder fusionarse con el ovocito (García-Vázquez et al., 1998). Esta motilidad también se caracteriza por el desarrollo de quimioatracción por componentes específicos del tracto genital femenino (Florman et al., 2008).

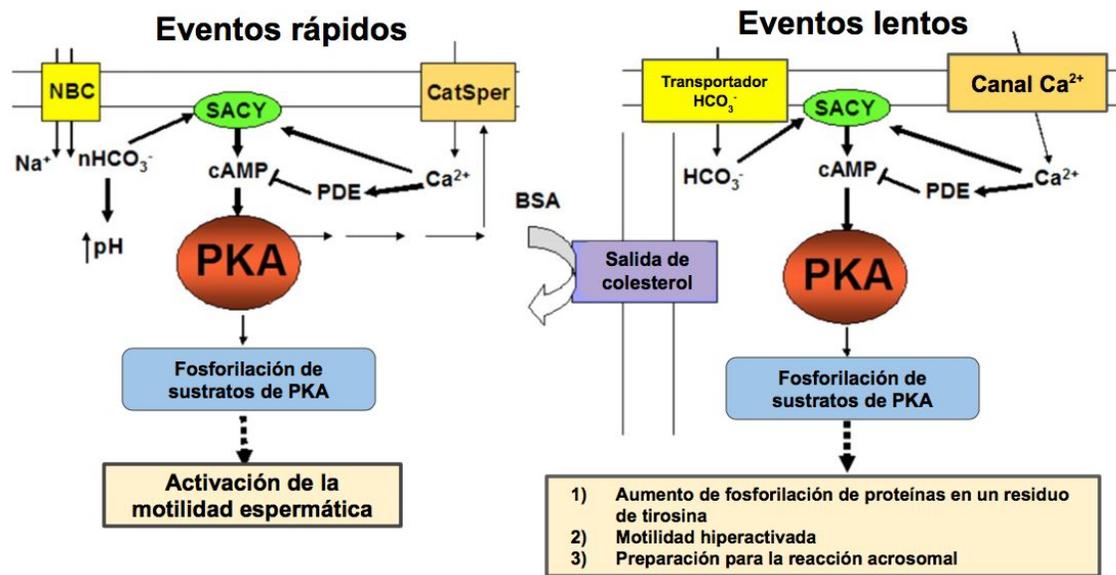


Fig. 3 Eventos lentos y rápidos de la capacitación. Los eventos rápidos de la capacitación activan el movimiento progresivo del espermatozoide a través de la fosforilación de sustratos de PKA a tiempos tempranos de la capacitación. Los eventos lentos modifican el patrón de movimiento del espermatozoide produciendo lo que se denomina motilidad hiperactivada en etapas tardías de la capacitación. Moléculas participantes: cotransportador sodio/bicarbonato (NBC); adenilato ciclasa soluble (sACY); transportador de calcio específico del espermatozoide (CatSper); AMP cíclico (cAMP); fosfodiesterasas (PDE); proteína cinasa A (PKA), albúmina de suero bovino (BSA). Modificado de Visconti (2009):

[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144927>]

Cabe destacar que aproximadamente la mitad de los espermatozoides no presentarán fosforilación de proteínas tras el proceso de capacitación tanto en humanos como en ratones, esto se debe a diferencias de sensibilidad que presentan las proteínas de las subpoblaciones de espermatozoides dentro de un mismo eyaculado (Urner y Sakkas, 2003). Tras el proceso de capacitación los espermatozoides adquieren la capacidad de llevar a cabo un proceso denominado reacción acrosomal.

In vitro es posible mimetizar la composición de electrolitos presentes en el tracto genital femenino (diferente para cada especie) y capacitar a los espermatozoides previamente colectados del eyaculado directamente u obtenidos de la región caudal del epidídimo. Es imprescindible que el medio capacitante contenga los siguientes elementos:

- Una fuente de energía. Puede ser glucosa, lactato, piruvato o una combinación de las anteriores.
- Un aceptor de esteroides, usualmente es albúmina.
- NaHCO_3 y Ca^{2+} (Visconti y Kopf, 1998).

2.7 REACCIÓN ACROSOMAL

El ovocito es una célula haploide cuya membrana plasmática se encuentra rodeada por una capa de glicoproteínas denominada zona pelúcida. Esta a su vez se encuentra recubierta de células somáticas inmersas en ácido hialurónico que, durante la maduración del gameto se multiplican de manera importante y desarrollan un espacio libre de células y lleno de fluido llamado antro. Las células que rodean al gameto reciben diferentes nombres según su posición. Las más alejadas reciben el nombre de teca, le siguen las células de la granulosa y finalmente aquellas que rodean directamente al ovocito reciben el nombre de corona radiada. A esta estructura en su totalidad se le denomina folículo de Graaf (Figura 4) y se encuentra preparado para ser fertilizado, sin embargo, para que esto ocurra el espermatozoide deberá atravesar estas capas para lograr la singamia.

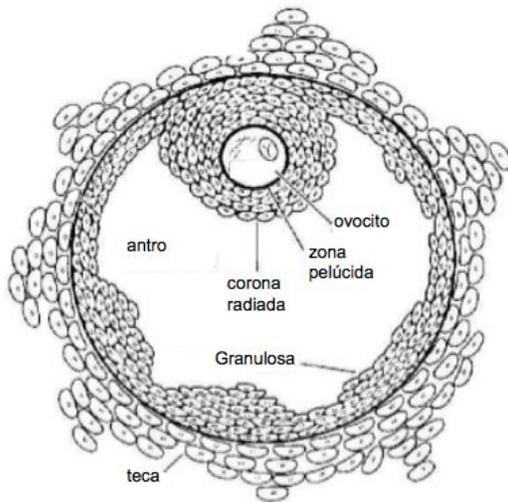


Fig. 4 Estructura del folículo ovárico maduro. El ovocito se encuentra protegido por la zona pelúcida y células somáticas que en forma de conjunto forman un folículo de Graaf. La membrana plasmática de un ovocito recibe el nombre de oolema. Modificado de Chang y Conti (2016):

[<https://www.sciencedirect.com/topics/veterinary-science-and-veterinary-medicine/theca-externa>]

El espermatozoide de los mamíferos tiene una región membranosa en la zona apical de la cabeza que se denomina acrosoma. Esta estructura se deriva del aparato de Golgi y contiene una gran cantidad de enzimas entre las que se encuentran: acrosina, colagenasa, esterasa, fosfatasas, fosfolipasas, hialuronidasa y proteinasas (Chavarría-Olarte y Reyes-Fuentes, 1998). Las enzimas contenidas en esta única vesícula se vierten a través de un proceso de exocitosis en una etapa temprana de la interacción entre los gametos permitiendo al espermatozoide atravesar la zona pelúcida del ovocito y fusionarse con él, a este proceso irreversible se le denomina reacción acrosomal y está regulado por la zona pelúcida del óvulo. Este proceso de exocitosis requiere de la fusión de la membrana externa acrosomal con la membrana plasmática del espermatozoide.

Es imprescindible que la reacción acrosomal ocurra únicamente al final de la cadena de eventos biofísicoquímicos mencionados anteriormente, de llevarse a cabo de manera espontánea y prematura el espermatozoide no podrá llegar hasta el ovocito ni fusionarse con el mismo. La reacción acrosomal temprana ocurre en un grupo de espermatozoides dentro del eyaculado, se ha sugerido que esta es una forma de garantizar que sólo los

espermatozoides de la mejor calidad tengan oportunidad de fusionarse con el ovocito (Breitbart y Etkovitz, 2011).

Una vez capacitado el espermatozoide, este será capaz de abrirse paso a través de las tecas y la corona radiada del folículo ovárico hasta llegar a la zona pelúcida, región específica donde se lleva a cabo la reacción acrosomal. Su membrana plasmática y acrosoma deberán estar íntegros hasta este punto.

Existen varios agentes en el tracto reproductor femenino que desencadenan la reacción acrosomal, entre los cuales se encuentran la progesterona, la glicoproteína ZP3, el factor de crecimiento epidermal (EGF) y las prostaglandinas (Breitbart y Etkovitz, 2011). El reconocimiento de la glicoproteína ZP3 es la vía de señalización mejor estudiada dentro de este proceso y se sabe que esta es el ligando primario, pero existen varios mecanismos de interacción receptor/ligando participando en la reacción acrosomal complementarios a este inmersos en las MZRCs (Reid et al., 2011).

La zona pelúcida es una región no celular compuesta por una serie de glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 y ZP3 que forman filamentos y se unen de manera no covalente. En el extremo anterior de cabeza del espermatozoide se encuentran localizadas diversas proteínas membranales capaces de reconocer a ZP3 tales como β -1,4-galactosiltransferasa y fucosiltransferasa-5 (Reid et al., 2011). La interacción entre estas moléculas promueve un enlace irreversible entre ZP3 y estos ligandos que son receptores acoplados a la proteína G. Lo anterior provoca la liberación de las reservas internas de calcio al citosol y produce una serie de eventos que resultan en la despolarización de la membrana, un flujo sostenido de entrada de Ca^{2+} , una disminución del pH intracelular, la fosforilación de proteínas en un residuo de tirosina en la pieza media y consecuentemente, el inicio de la reacción acrosomal (Georgadaki et al., 2016). Por lo tanto se considera que la proteína ZP3, en el grupo de los mamíferos, ejerce un efecto agonista respecto a la reacción acrosomal (Florman et al., 2008). Por otro lado la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) a través de proteínas G provoca una cascada de señales que activan a la proteína gelsolina que participa en la despolimerización de los filamentos de actina F que bloqueaban el espacio comprendido entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal permitiendo la exocitosis (Breitbart y Etkovitz, 2011).

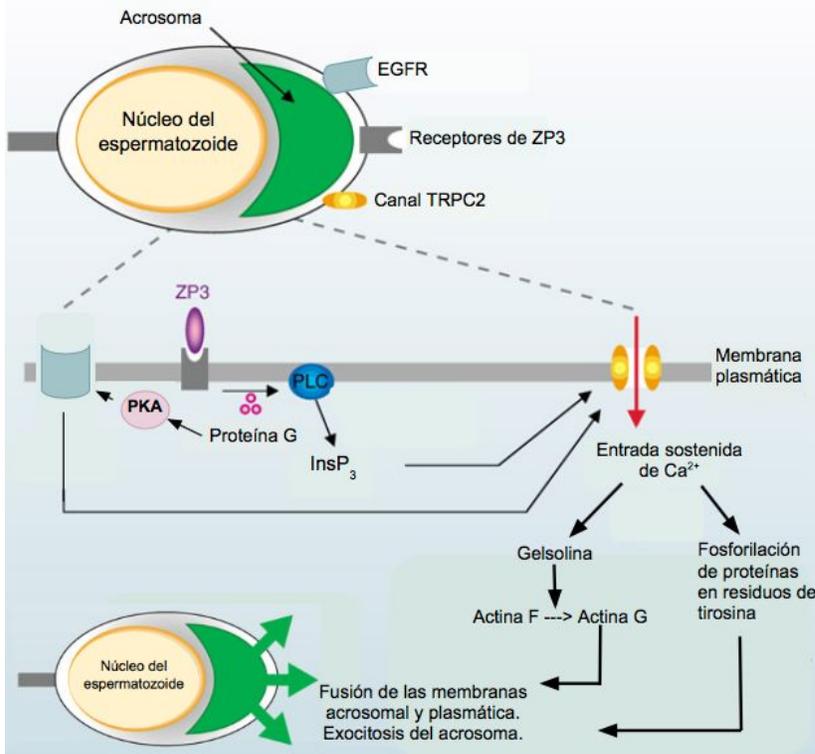


Fig. 5 Eventos de señalización involucrados en la reacción acrosomal. Diversos receptores reconocen a la glicoproteína del ovocito ZP3. Esta unión activa a proteínas G que a través de diferentes vías de señalización incrementan la concentración de calcio intracelular desde espacios extra e intracelulares, y activan a la gelsolina que participa en la despolimerización de filamentos de actina F. Todo lo anterior resulta en la exocitosis de las enzimas de la vesícula acrosomal. Moléculas participantes: receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR); fosfolipasa C (PLC), proteína cinasa A (PKA), inositol trifosfato (InsP_3). Modificado de Evans y Florman (2002):

[https://www.nature.com/fertility/content/fig_tab/ncb-nm-fertility57_f2.html]

Cabe destacar que la zona pelúcida no sólo es responsable de mediar la unión entre los gametos, sino que evita la polispermia además de asegurar una interacción exclusiva y específica entre organismos de la misma especie (Henkel et al., 2005).

Al finalizar la reacción acrosomal, aumenta la concentración de integrinas y de fibronectina en la membrana del espermatozoide (García-Vázquez et al., 1998). Lo anterior se traduce en la ganancia de la capacidad para fusionarse con el oolema (membrana plasmática del ovocito) dando comienzo al proceso de singamia (Henkel et al, 2005). Una vez desencadenada la reacción acrosomal e iniciado el proceso de fusión de

membranas, el espermatozoide perderá fuerza en el batimiento del flagelo hasta que deje de moverse por completo.

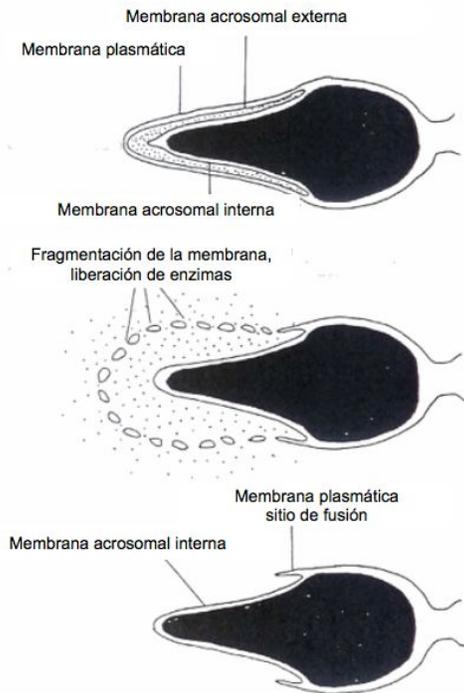


Fig 6. Exposición de la zona de fusión tras la reacción acrosomal. El acrosoma es una estructura membranosa delimitada por una membrana externa que se encuentra en contacto directo con la región apical de la membrana plasmática (MP) y una membrana interna que está directamente en contacto con la teca perinuclear. Durante la reacción acrosomal la membrana acrosomal externa se fusiona con la MP en su región apical, permitiendo el vaciamiento del contenido enzimático de la vesícula acrosomal. Una vez liberado el contenido del acrosoma queda expuesta la membrana acrosomal interna y la región ecuatorial de la MP que se fusionará con la MP del ovocito. Modificado de Natisens:

[<https://www.natisens.com/le-spermatozoide-et-ovule-une-relation-fusionnelle/>]

2.8 FERTILIZACIÓN

La fertilización es un evento exclusivo de la reproducción sexual en el cual dos células haploides complementarias llamadas gametos se fusionan para formar una célula diploide denominada cigoto capaz de desarrollarse en un nuevo organismo. El gameto femenino se denomina óvulo y se forma a través de un proceso denominado ovogénesis, mientras que el gameto masculino recibe el nombre de espermatozoide y se desarrolla mediante el proceso de espermatogénesis.

La fertilización en mamíferos es un proceso complejo que ocurre en el oviducto del tracto genital femenino. Está precedido por una serie de eventos que culminan en la singamia y deben ocurrir en un orden específico:

- a) Gametogénesis. Es la formación de los gametos en las gónadas.
- b) Maduración meiótica del óvulo y capacitación espermática. Estos eventos preparan a los gametos para su interacción.
- c) Paso del espermatozoide a través de la porción celular (cumulus oophorus) del folículo de Graaf.
- d) Unión del espermatozoide a la zona pelúcida. Esta cubierta de glicoproteínas del folículo funciona a manera de barrera que evita la fecundación interespecífica, al no permitir que espermatozoides de diferentes especies se unan a esta región (Wassarman, 1999).
- e) Reacción acrosomal. Exocitosis regulada de enzimas que permite al espermatozoide atravesar la zona pelúcida.
- f) Fusión de las membranas de los gametos.
- g) Fusión de los núcleos de los gametos.

2.9 FERTILIZACIÓN ASISTIDA

En la actualidad existen una gran cantidad de parejas que enfrentan problemas para lograr embarazarse, la Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente 15% de las parejas alrededor del mundo presentan problemas de fertilidad, siendo la infertilidad masculina responsable de aproximadamente 30% de los casos (Agarwal, 2015). Es por esto por lo que muchas de estas parejas recurren a las técnicas de fertilidad asistida que son un conjunto de tratamientos destinados a auxiliar a personas con dificultad para concebir. Incluye las técnicas de inseminación intrauterina, fertilización *in vitro* y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Estos procedimientos se aplican dependiendo la gravedad de la infertilidad siendo la primera utilizada para los casos menos complejos y la última para los casos más complicados, lo anterior tiene un

impacto directo en el precio del procedimiento, a mayor complejidad mayor costo (Tardif et al., 2014).

La fertilización *in vitro*, que consiste en fertilizar ovocitos fuera del cuerpo humano, es una de las técnicas más empleadas y popularizadas a nivel mundial. El primer caso exitoso en humanos se llevó a cabo en Lesley Brown a quien, sin recibir tratamiento hormonal, se le implantó su óvulo previamente fertilizado en el laboratorio resultando en el nacimiento de su hija Louise Brown en 1978 (Wang y Sauer, 2006). Paralelo al uso de esta tecnología se han llevado a cabo diversos debates acerca de las posibles consecuencias de intervenir en los procesos de selección natural.

Para lograr una fertilización *in vitro* exitosa se toman en cuenta varios parámetros dentro de una muestra de espermatozoides (provenientes de un eyaculado o aspirados del epidídimo) (OMS, 2010) a continuación se mencionan dos que resultan relevantes para el presente trabajo:

- **Motilidad.** Se encuentra relacionada directamente con la capacidad de poder fertilizar al óvulo y también es considerada un criterio para determinar si los gametos masculinos están vivos. Se denomina astenozoospermia a una disminución de la motilidad de los espermatozoides que impide una fertilización adecuada (Hidalgo-Ordoñez, 2005).
- **Morfología.** Se considera un excelente parámetro para determinar las probabilidades de éxito de una fertilización *in vitro* puesto que podrá determinar la motilidad del gameto así como su capacidad para llevar a cabo una reacción acrosomal en tiempo y la de interactuar con la zona pelúcida del ovocito. Puede determinarse con la ayuda de un microscopio óptico tras una capacitación apropiada. Se denomina teratozoospermia a aquella condición donde la morfología de los espermatozoides compromete su capacidad reproductiva (Hidalgo-Ordoñez, 2005).

Estudiar esta y otras características de una población de espermatozoides es una forma de sustituir los procesos de selección llevados a cabo por el tracto genital femenino

durante la migración, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide, así como la selección del óvulo que lleva a cabo durante la fusión de los gametos (Hidalgo-Ordoñez, 2005).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO

Los daños estructurales y funcionales son comunes en espermatozoides de individuos subfértiles e infértiles, condiciones que se complican aún más en muestras que se encuentran criopreservadas (Oskavukcu et al., 2008). Es por esto por lo que se ha buscado encontrar algún agente que mejore la motilidad y funcionalidad de estas células sin comprometer el desarrollo del embrión. El tratamiento más usado para este fin es la pentoxifilina (PTX).

Kalthur et al (2012) han propuesto a la biotina como molécula para incrementar la motilidad del espermatozoide en el proceso de fertilización *in vitro* como una alternativa a la pentoxifilina ante la duda que esta última pueda ocasionar daños durante el desarrollo del embrión.

En su estudio, Kalthur et al (2012) adicionaron biotina en diferentes concentraciones a espermatozoides incubados en medio EBSS (Earl's Balanced Salt Solution) con albúmina a 37°C y 5% CO₂. Utilizaron espermatozoides humanos de individuos normozoospermicos y de hombres que presentaron condiciones de astenozoospermia y oligospermia, entre otras. Sus resultados revelaron que la biotina a una concentración 10 nM incrementó el movimiento progresivo de los espermatozoides y lo prolongó hasta pasadas cuatro horas, con respecto a la muestra control, pero no fue significativamente mayor a las incubadas con pentoxifilina (PTX). Salian et al (2019) confirmaron un aumento en la motilidad de los espermatozoides humanos al utilizar una concentración de biotina de 10 nM, agregando que no se registró daño a la integridad del ADN y no se disparó una reacción acrosomal temprana. Adicionalmente, al aplicar esta dosis a espermatozoides de ratón concluyeron que la biotina en el medio capacitante mejora su potencial de fertilización y la preimplantación de embriones. Es por esto que los autores sugieren que la biotina podría ser utilizada en la técnica de fertilización *in vitro* debido a que se trata de un micronutriente, del cual no se ha reportado toxicidad (Zempleni, 1999). Sin embargo, un

estudio reciente en nuestro laboratorio encontró que la administración de una dieta suplementada con biotina durante ocho semanas, con la que se alcanzan concentraciones séricas de [590 nM] produce cambios en la morfología y estructura de otros tejidos, especialmente del testículo, lo que sugiere que los efectos de esta vitamina deben ser cuidadosamente estudiados antes de emplearse en cualquier tipo de tratamiento médico.

4. HIPÓTESIS

La adición de biotina al medio capacitante modificará la morfología y la motilidad del espermatozoide de ratón dependiendo de la dosis.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la biotina sobre el espermatozoide de ratón en la capacitación y la reacción acrosomal *in vitro*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los efectos de la biotina sobre la:

1. Motilidad del espermatozoide durante su capacitación.
2. Fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina que se produce durante la capacitación.
3. Morfología del espermatozoide durante la capacitación *in vitro*.
4. Reacción acrosomal.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 REACTIVOS

El medio M16, cloruro de potasio, Tritón X-100, Tween 20, azul de bromofenol, y rojo de Ponceau fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Las membranas

de nitrocelulosa, acrilamida, N,N'-metilen-bisacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina, persulfato de amonio, marcador de peso molecular *Dual Color* y leche para bloqueo se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). Los anticuerpo Anti-tyr (Phospho-Tyrosine Mouse mAb (P-Tyr-100) #9411) y horse Anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (#70765 Lot. 33) se adquirieron de Cell signaling Technology, Inc (Danvers, MA, EUA). El anticuerpo secundario Cy⁵ de Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, EUA). El reactivo de quimioluminiscencia (ECL) mejorado se adquirió de Millipore (Billerica, MA). El fosfato de sodio, fosfato de potasio, glicerol, cloruro de amonio y metanol fueron adquiridos de J.T. Baker Co. (Phillipsburg, NJ, EUA). El cloruro de sodio fue adquirido de laboratorios Merk (Kenilworth, NJ, EUA). El tris base fue adquirido de MP Biomedicals LIC (Santa Ana, CA, EUA).

6.2 ANIMALES

Se emplearon ratones macho de la cepa BALB/c de entre 8 y 11 semanas de edad, con un perfil microbiológico definido y certificado de parasitología negativo. Los animales se mantuvieron en área de barrera de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), donde se encontraban alojados bajo las siguientes características técnicas: ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, temperatura 21-23°C, humedad promedio del 40% y agua y alimento (dieta proporcionada por el bioterio) *ad libitum*. Estos parámetros fueron supervisados dentro de los rangos de la NOM 062 ZOO (1999) que brinda las condiciones técnica y científicamente óptimas para el manejo de animales de experimentación.

Todos los experimentos con animales y los procedimientos de manipulación fueron aprobados por la Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias, UNAM. Folio T_2019_02_021.

6.3 OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Los animales fueron anestesiados con Sevorane y posteriormente sacrificados por dislocación cervical. A través de una incisión en V en la región abdominal inferior se extrajo el complejo testículo-epidídimo-conducto deferente. Con una pinza fina se retiraron

las irrigaciones arteriovenosas y tejido adiposo. Se separaron la cauda del epidídimo y el conducto deferente para luego ser cortados en pequeños fragmentos en 1 ml de NaCl al 0.9% a 37° C con el propósito de liberar a los espermatozoides. Transcurridos 20 minutos se filtró el líquido a través de una malla de *nylon* para eliminar restos de tejidos. Esta suspensión se centrifugó a una velocidad de 3500 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804 R) durante tres minutos a 24° C. La pastilla de espermatozoides que se obtuvo se resuspendió nuevamente en 1 ml de NaCl al 0.9%. Los espermatozoides recién extraídos se observaron al microscopio de luz para descartar anomalías en la motilidad o contaminación por otro tipo celular.

Posteriormente para determinar la concentración de espermatozoides se tomó una alícuota de 25 µl de la suspensión de interés y se diluyó 19 veces en una solución de PBS Tritón X-100 al 0.1% para evitar la formación de rosetas. La mezcla se agitó en vortex durante diez segundos. El número de espermatozoides se determinó utilizando una cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 3.5×10^6 células.

6.4 CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS Y TRATAMIENTO CON BIOTINA

Los espermatozoides se capacitaron en tubos Eppendorf, adicionando 500 µL de medio capacitante M16 (Sigma) por cada par de epidídimos procesados. Posteriormente se añadió biotina a algunas de las muestras según los tratamientos de interés. Se manejaron los siguientes grupos para ensayos de capacitación:

- Capacitados sin biotina (grupo control)
- Capacitados [10 nM] biotina
- Capacitados [100 nM] biotina

Una vez incorporada la biotina se colocaron las muestras en una incubadora marca Nuair a 37° C con CO₂ al 5%. Se detuvo la reacción de capacitación a los tiempos 0, 30, 60 y 120 minutos para cada grupo centrifugando la muestra a 3500 rpm y decantando el medio capacitante. El tratamiento posterior que recibieron los *pellets* dependió del ensayo que se realizaría.

6.5 ELECTROFORESIS E INMUNOBLOT DE PROTEÍNAS

Para determinar el estado fosforilado de las proteínas del espermatozoide se empleó el método descrito por Visconti et al., 1995, con ligeras modificaciones. Los espermatozoides de la región caudal del epidídimo y del conducto deferente sometidos a los diferentes tratamientos (capacitados y capacitados en presencia de 10 nM y 100 nM de biotina) fueron centrifugados a 3500 rpm durante 3 minutos a 24°C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y los espermatozoides se resuspendieron en 50 µl de amortiguador Laemmli (libre del agente reductor β-mercaptoetanol) y se conservaron a -70°C durante 24 horas. Las muestras fueron hervidas durante 5 minutos, enseguida se centrifugaron a 4500 g's (Eppendorf Centrifuge 5804 R) por 3 minutos, se recuperó el sobrenadante y fue calentado en presencia de β-mercaptoetanol al 5%. Las proteínas se separaron por electroforesis en PAGE en presencia de SDS al 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó utilizando 0.15 M NaCl, 0.050 M TRIS-HCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6 a 25°C (TBS-TWEEN) con leche en polvo sin grasa al 5%. La membrana se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo respectivo (Mouse Anti p-Tyr). Las membranas fueron lavadas con TBS-TWEEN 0.1% tres veces durante cinco minutos. Después se incubaron con el anticuerpo secundario *horse Anti-mouse* marcado con HRP (1:2000). Las proteínas inmunorreactivas se detectaron por quimioluminiscencia utilizando un kit de detección ECL Western blot (Millipore). Para verificar la especificidad de los anticuerpos, la inmunodetección se realizó usando solo el anticuerpo secundario, bajo estas condiciones, las bandas de proteínas no se observaron o se redujeron drásticamente (datos no mostrados).

6.6 FIJACIÓN DE CÉLULAS

Los espermatozoides se fijaron usando formaldehído al 1.5% en PBS durante 15 minutos. Posteriormente se incubaron en NHCl₄ 50 mM en PBS durante 15 minutos. Se realizaron dos lavados por resuspensión/centrifugación en PBS. Finalmente, se resuspendieron en PBS y se conservaron a 4°C.

6.7 ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Tras el proceso de fijación, se montaron 1×10^6 células en cada laminilla. Los espermatozoides de las muestras fueron permeabilizados con 200 μ l de PBS-Tritón 0.1% a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se realizaron dos lavados con 500 μ l de PBS. Las laminillas se incubaron con anticuerpo primario (anti p-Tyr 1:250) en solución de bloqueo 1% en PBS durante 12 horas a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS y se incubaron las muestras con anticuerpo secundario apropiado conjugado con Cy⁵ durante dos horas a 37 °C dentro de una cámara húmeda. Finalmente, las muestras se lavaron extensivamente con PBS y se montaron con PBS-glicerol 1:1 antes de ser selladas con barniz.

Las imágenes de fluorescencia fueron generadas con un microscopio óptico invertido (Nikon TiE, Nikon Corporation, Tokio, Japón) equipado con un cabezal de confocal de escaneo con láser (Nikon A1R+, Nikon). Para la excitación de la muestra, se utilizó un objetivo Plan Apo TIRF Oil DIC N.A. 1.49 y una excitación láser secuencial de 402 y 561 nm a una potencia de 8 y 0.21 mW respectivamente. Para la detección de la fluorescencia, se utilizó un diámetro de pinhole de 24.27 μ m, detectores galvanométrico estándar y GaAsP y el control de la captura se realizó mediante el software NIS-Elements AR C v. 5.00 (Nikon) en la unidad de microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

6.8 ESTIMACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL Y DAÑO MORFOLÓGICO

La reacción acrosomal se determinó mediante el examen de muestras fijadas previamente y teñidas con azul de Coomassie en microscopio óptico.

Se montaron en una laminilla limpia y seca 1×10^6 células, dejándose secar *overnight* a temperatura ambiente. Una vez secas, se rehidrataron las muestras con 300 μ l de agua bidestilada durante 10 minutos. Se desechó el agua, se adicionaron 300 μ l de azul de Coomassie y se dejó teñir durante 10 minutos. Se eliminó el exceso de colorante y se realizaron tres lavados con agua bidestilada durante 10 minutos cada uno. Se desechó el

exceso de agua. Se colocaron las laminillas en 50 μ l de PBS-glicerol 1:1 como fluido de montaje. Se sellaron las muestras con barniz.

Utilizando un microscopio óptico y un contador manual se cuantificaron por triplicado 300 espermatozoides por muestra, determinando cuántos tenían presencia del complejo acrosomal y cuántos carecían de este.

Los 300 espermatozoides que se cuantificaron por muestra, se clasificaron en dos grupos: espermatozoides sin daño y espermatozoides dañados. Se utilizaron imágenes de campo claro para determinar la presencia de daños morfológicos, adquiridas con un microscopio óptico (Olympus BX-51WI. Olympus Corporation, Tokio, Japón) acoplado a unidad de disco giratorio (DSU), utilizando un objetivo Olympus UPlanSAPO 60X WI N.A. 1.20, una cámara digital CCD RGB MicroBrightField modelo CX9000 (MBF Bioscience, Williston, Vermont, E.U.A.) y el software Stereo Investigator v. 9.0.1 (MBF Bioscience) en la unidad de microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

6.9 Evaluación de la movilidad de los espermatozoides

La movilidad de los espermatozoides durante la capacitación *in vitro* se evaluó utilizando un microscopio invertido (ICM 405) y se grabaron videos con una cámara Nikon (China) a un aumento 5X. Las imágenes adquiridas fueron analizadas visualmente. La clasificación de los tipos de movilidad que muestra el quinto manual de la Organización Mundial de la Salud es (OMS, 2010):

- I) Inmóviles. Los espermatozoides no presentan ningún tipo de movimiento.
- II) Movilidad no progresiva. Los gametos se mueven sin desplazarse o avanzar.
- III) Movilidad progresiva. El movimiento puede ser de tipo lineal o en círculos amplios, en ambos casos los espermatozoides avanzan hacia adelante (sin importar la velocidad).

6.10 ESTADÍSTICA

Los datos representan la media \pm ES. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Los datos se

analizaron por medio de un ANOVA de una vía. Los valores de p menores a 0.05 son considerados estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la adición de biotina al medio capacitante sobre la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina

Para determinar si la biotina ejerce un efecto sobre la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, se capacitaron espermatozoides en presencia de biotina a concentraciones de 10 y 100 nM. La incubación se detuvo a los 30, 60 y 120 minutos. Posteriormente se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia con el anticuerpo que reconoce los residuos de tirosina fosforilados (p-Tyr).

Al cabo de 30 minutos se observó que la biotina aumentó la señal de fosforilación de residuos de tirosina durante el proceso de capacitación en espermatozoide. Los espermatozoides capacitados en presencia de biotina presentaron fosforilaciones en residuos de tirosina a lo largo del flagelo y en la cabeza, a diferencia del grupo control que presentó las fosforilaciones en el flagelo. La señal emitida por los grupos adicionados con biotina fue mayor respecto al control (Fig. 7A). En tanto que en los ensayos de *Western Blot* se observó una sola banda de peso molecular de 90 kDa que corresponde al patrón tipo del estado capacitado de este tiempo (Visconti et al., 1995; Urner et al., 2001), pero no se observaron diferencias entre los grupos en el grosor de las bandas de proteína fosforilada (Fig. 7B).

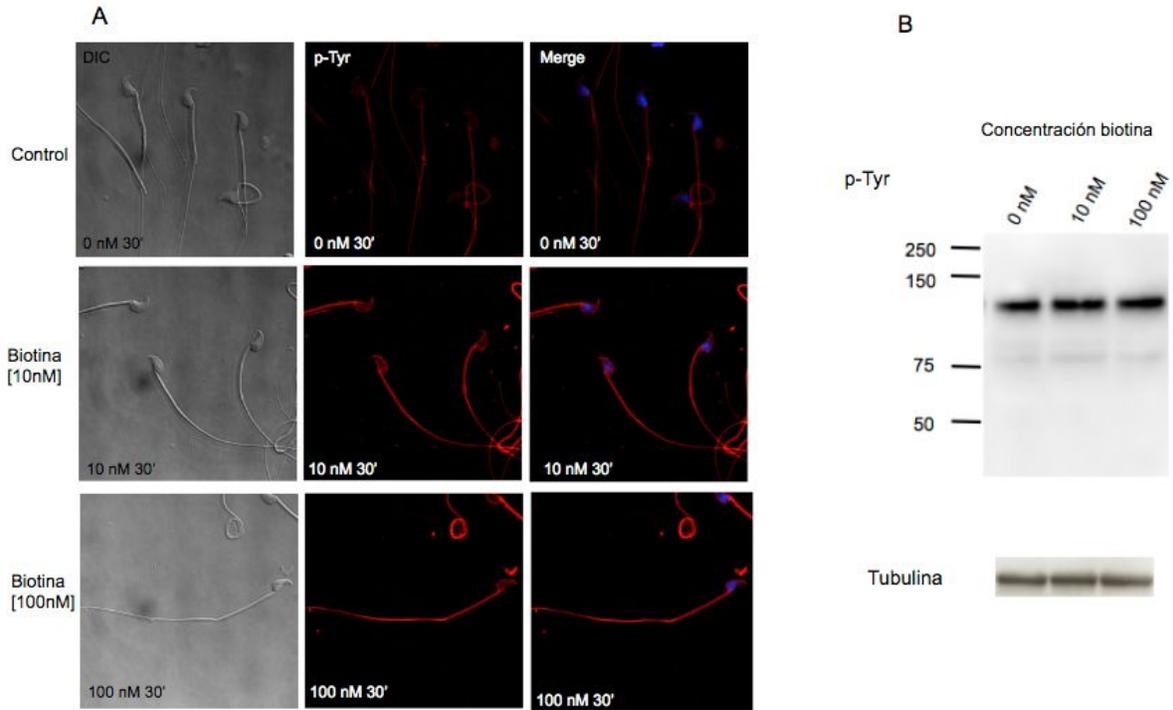


Fig. 7 La adición de biotina al medio capacitante aumenta la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina al cabo de 30 minutos. (A) Imágenes de inmunofluorescencia de espermatozoides de ratón capacitados en ausencia de biotina (control) y en presencia de biotina a dos concentraciones (10 y 100 nM) al término de 30 minutos para detectar fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (rojo). (B) Ensayo de Western blot para detectar la cantidad de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en espermatozoides capacitados en un medio capacitante en ausencia de biotina (control) y en presencia de biotina a dos concentraciones (10 y 100 nM) al término de 30 minutos.

Al transcurrir 60 minutos del proceso de capacitación, la biotina incrementó la fosforilación en residuos de tirosina en la cabeza y cola de los espermatozoides, estas muestras mostraron una mayor fosforilación, mientras que aquellos pertenecientes al grupo control presentaron una fosforilación menos intensa y empezó a detectarse señal en la región de la cabeza (Fig 8 A). En tanto que, en los ensayos de *Western Blot* se observaron dos bandas de peso molecular de 90 y 70 kDa. La intensidad de la banda de 90 kDa es mayor en los espermatozoides que fueron capacitados en presencia de biotina (Fig. 8 B).

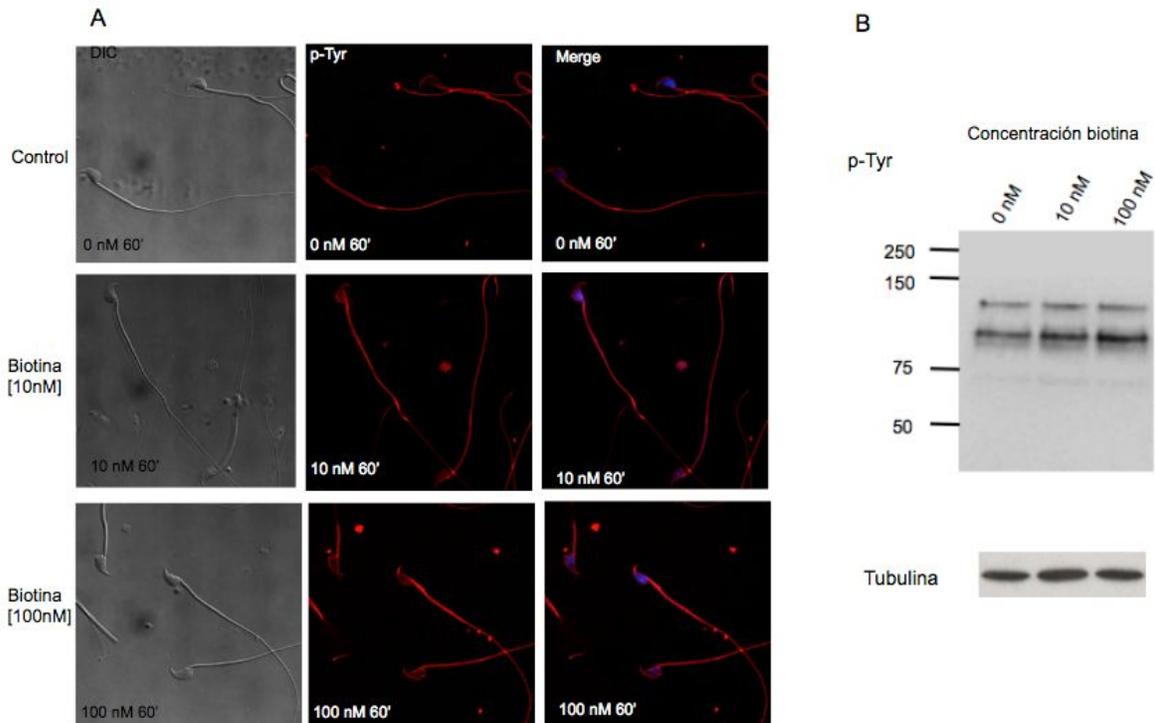


Fig. 8 La adición de biotina al medio capacitante aumenta la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina al cabo de 60 minutos. (A) Imágenes de inmunofluorescencia de espermatozoides de ratón capacitados en ausencia de biotina (control) y en presencia de biotina a dos concentraciones (10 y 100 nM) al término de 60 minutos para detectar fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (rojo). (B) Ensayo de Western blot para detectar la cantidad de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en espermatozoides capacitados en un medio capacitante en ausencia de biotina (control) y en presencia de biotina a dos concentraciones (10 y 100 nM) al término de 60 minutos.

Al término de 120 minutos la biotina aumentó la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en los espermatozoides capacitados con biotina a una concentración de 10 nM, respecto a los espermatozoides del grupo control, en las muestras se aprecia una mayor fosforilación de las células (Fig. 9 A) y un aumento en las bandas de proteína en el ensayo de *Western blot* (Fig. 9 B). A diferencia de los tiempos anteriores, los espermatozoides capacitados con biotina a una concentración 100 nM mostraron una marcada disminución en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, las muestras correspondientes a esta concentración emitieron una menor señal con respecto a los controles (Fig. 9 A). De igual manera en el ensayo de *Western blot* las bandas de proteínas se vieron muy disminuidas (Fig. 9 B).

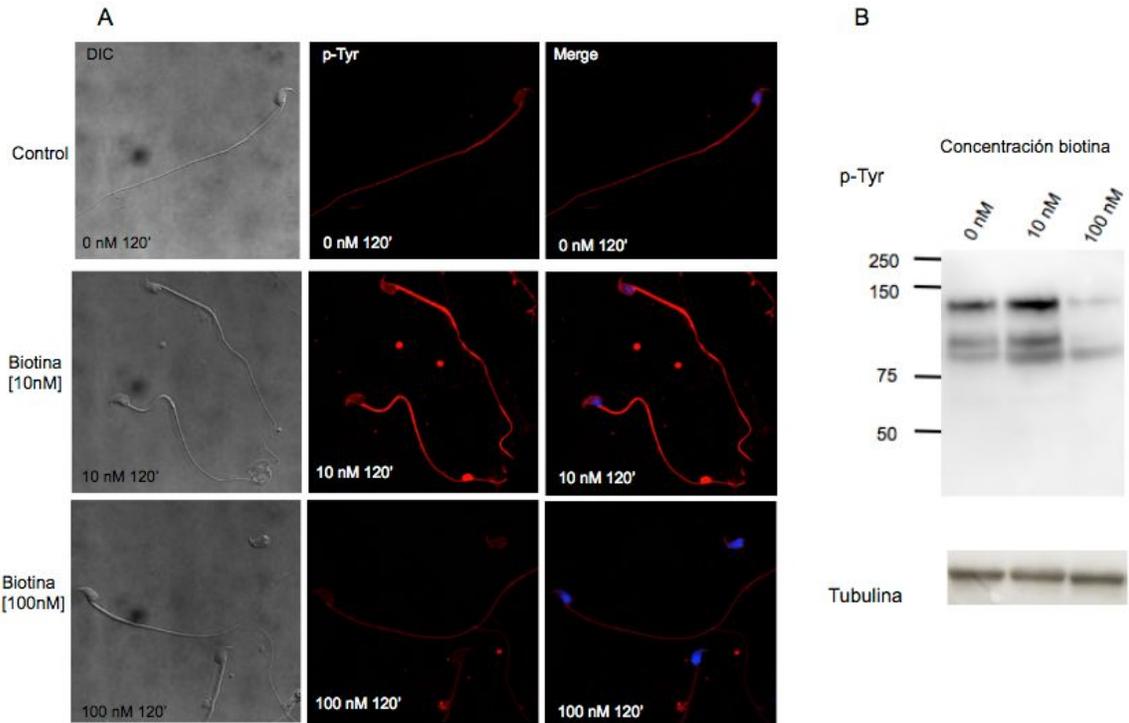


Fig. 9 La adición de biotina al medio capacitante produce diferentes efectos en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina al cabo de 120 minutos dependiendo de la dosis administrada (A) Imágenes de inmunofluorescencia de espermatozoides de ratón capacitados en ausencia de biotina (control) y en presencia de biotina a dos concentraciones (10 y 100 nM) al término de 120 minutos para detectar fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (rojo). (B) Ensayo de Western blot para detectar la cantidad de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en espermatozoides capacitados en un medio capacitante en ausencia de biotina (control) y en presencia de biotina a dos concentraciones (10 y 100 nM) al término de 120 minutos.

7.2 Efecto de la biotina sobre el flagelo y la cabeza del espermatozoide.

Para detectar daños de tipo morfológico durante la capacitación en presencia de biotina se tiñó a los espermatozoides, previamente fijados con formaldehído al 1.5%, con azul de Coomassie y se determinó la presencia de daño a través de la observación en microscopio óptico.

Al término de 30 minutos, se observaron principalmente doblamientos en la pieza media que en inglés han recibido el nombre de *hairpin loop* (Fig.10 B inferior) y *bent tail* (Fig.10 B

superior), y que en español corresponden al doblamiento tipo pasador de cabello y cola doblada respectivamente. La presencia de esta alteración fue significativa comparada con el grupo control (control= 30.5 ± 0.96 ; suplementado con 10 nM biotina= 35.9 ± 0.47 y 100 nM= 37.4 ± 1.16 $p < 0.01$) (Fig. 10 A).

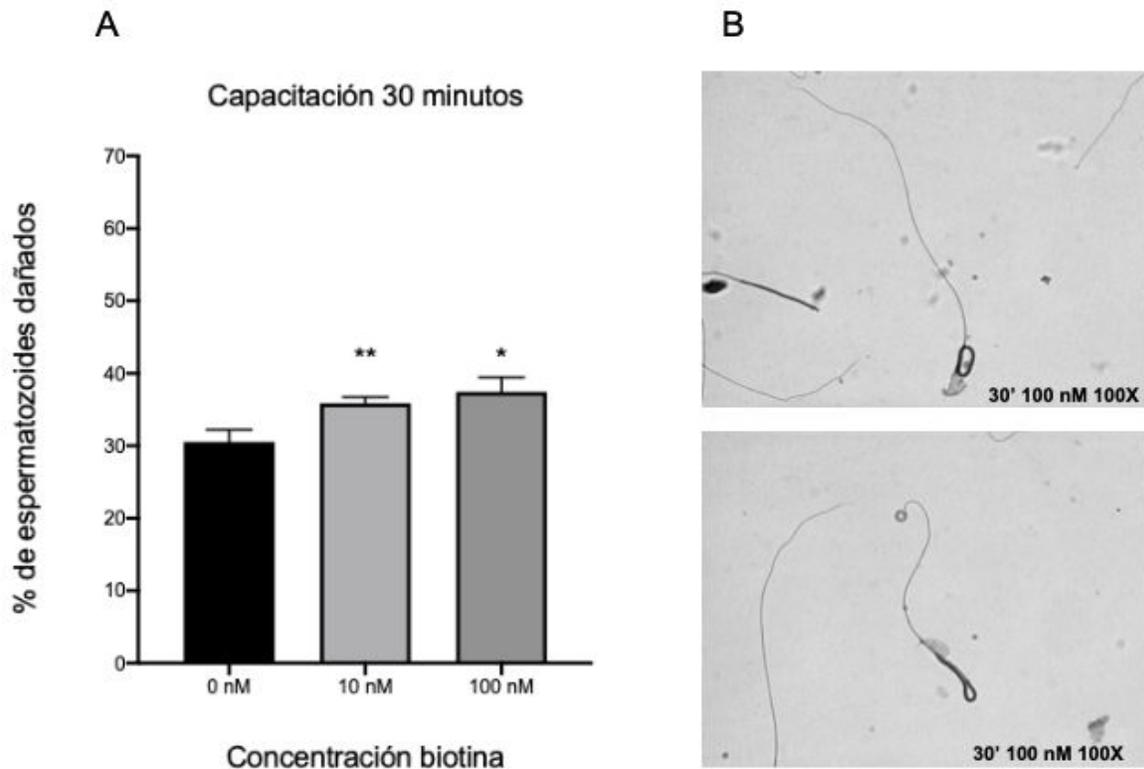


Fig.10 La adición de biotina al medio capacitante produce cambios en la morfología del espermatozoide. (A) Porcentaje de daño morfológico presentado en espermatozoides capacitados sin biotina (control) y capacitados en presencia de biotina (10 nM y 100 nM) al término de 30 minutos, * $p < 0.01$. (B) Fotografías de daños morfológicos presentados en espermatozoides capacitados en presencia de biotina a 10 y 100 nM al término de 30 minutos. Se observaron doblamientos en el pieza media (superior) y doblamientos tipo pasador de cabello (inferior).

Las muestras correspondientes al minuto 60 de capacitación mostraron también espermatozoides que presentaron daños de tipo *hairpin loop* y *bent tail*, pero se observaron nuevas alteraciones morfológicas en el gameto. Se registró daño a la cabeza (Fig.11 B superior izquierdo) así como desprendimiento total de la misma (Fig.11 B

superior derecho); daño a la pieza media, específicamente una discontinuidad de la misma (Fig.11 B inferior izquierdo) y células que presentaron más de un tipo de daño de los anteriormente descritos (Fig.11 B inferior derecho). La cantidad de espermatozoides dañados fue mayor en los grupos capacitados en presencia de biotina (control= 25 ± 1.25 ; suplementado = con 10 nM biotina = 40.2 ± 0.98 y 100 nM = 46.1 ± 1.35 ; $p < 0.005$).

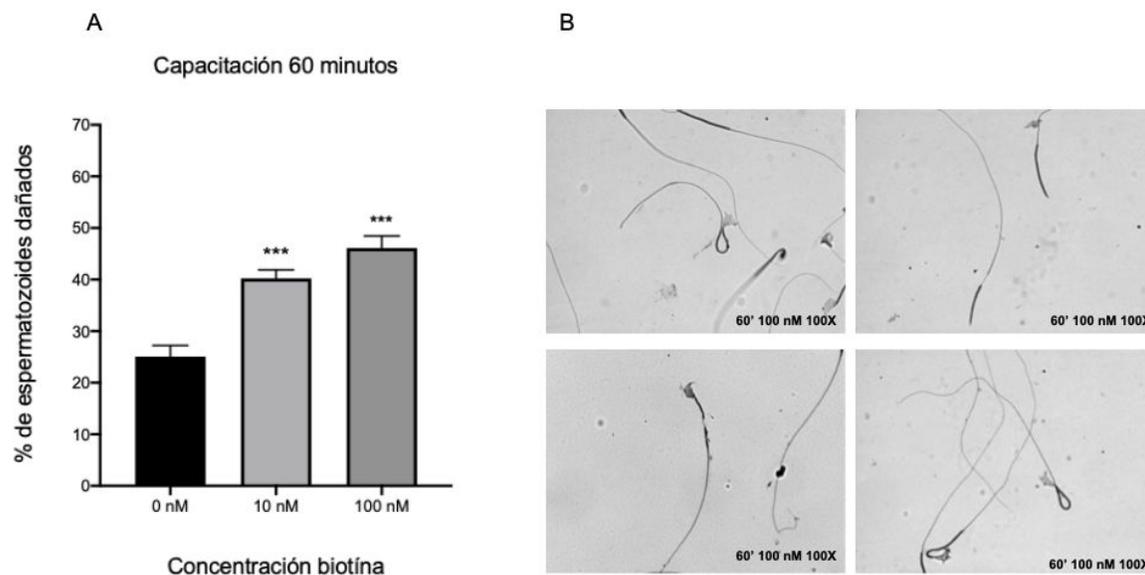


Fig.11 La adición de biotina al medio capacitante incrementa el daño morfológico en espermatozoides al término de 60 minutos. (A) Porcentaje de daño morfológico presentado en espermatozoides capacitados sin biotina (control) y capacitados en presencia de biotina (10 nM y 100 nM) al término de 60 minutos ($*p < 0.005$). (B) Fotografías de daños morfológicos presentados en espermatozoides capacitados en presencia de biotina a 10 y 100 nM al término de 60 minutos. Adicional a las anomalías presentados desde el minuto 30, surgieron nuevos patrones de daño conocidas como cabeza dañada (superior izquierdo), espermatozoides decapitados (superior derecho), flagelo interrumpido (inferior izquierdo) y combinaciones de daños a la cabeza y doblamientos en el flagelo (inferior derecho).

Las muestras correspondientes a los 120 minutos de capacitación indican que aquellos espermatozoides tratados con biotina presentaron mayor daño que el grupo control, especialmente la muestra con la mayor dosis de 100 nM. Se observaron todos los tipos de daños hasta ahora descritos solos o combinados (Fig.12 inferior), sin embargo, se apreció un nuevo tipo en el cual el flagelo se enroscó casi por completo sobre sí mismo, que se ha

denominado en inglés *random coiled* (Fig.12 superior). En la figura 12 se observa que la presencia de biotina provoca alteraciones significativas en el número de espermatozoides dañados (control=31.2 ± 0.917; suplementado con 10 nM biotina= 49.4 ± 2.01 y 100 nM=60.7 ± 1.4; p< 0.001).

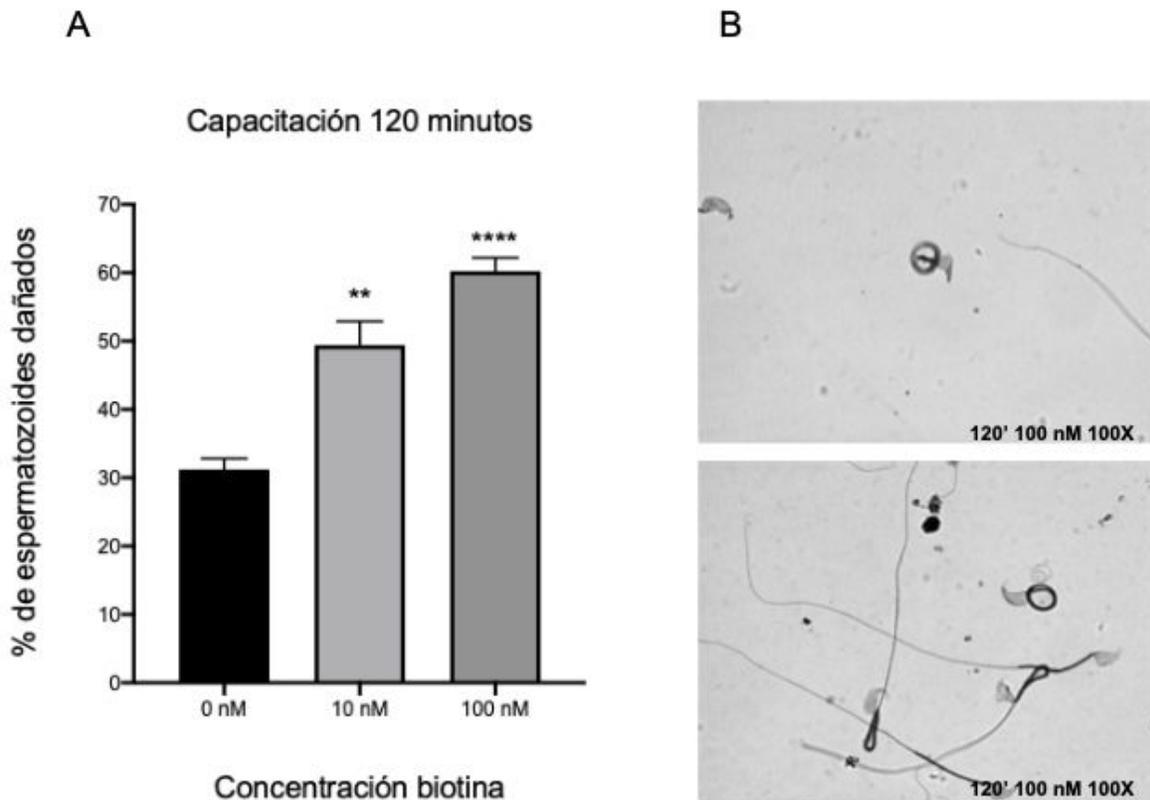


Fig.12 La adición de biotina al medio capacitante incrementa el daño morfológico en espermatozoides al término de 120 minutos. (A) Porcentaje de daño morfológico presentado en espermatozoides capacitados sin biotina (control) y capacitados en presencia de biotina (10 nM y 100 nM) al término de 120 minutos (*p<0.001). (B) Fotografías de daños morfológicos presentados en espermatozoides capacitados en presencia de biotina a 10 y 100 nM al término de 120 minutos. Se registró un nuevo tipo de daño en donde el flagelo se enroscó sobre sí mismo (superior), también se observaron daños al flagelo y la cabeza combinados, así como daños descritos anteriormente (inferior).

7.3 Efecto de la biotina sobre la reacción acrosomal.

Para determinar el efecto de la biotina sobre la reacción acrosomal se incubaron espermatozoides con medio capacitante M16 adicionado con biotina a una concentración de 10 y 100 nM. La valoración de la reacción acrosomal fue mediante la tinción con azul de Coomassie (Larson y Miller 1999) en donde la región acrosomal se tiñe intensamente de azul en caso de encontrarse presente (Fig. 13 A). Los datos mostraron que a partir de concentraciones de 10 nM la biotina estimula la reacción acrosomal desde los 30 minutos de incubación comparadas con el control (control, 40.8 ± 0.96 ; biotina 10 nM, 81.2 ± 1.7 ; biotina 100 nM, 80.4 ± 1.9 ; $p < 0.0001$ vs control). A los 60 minutos aumenta la reacción acrosomal con respecto al control (control, 50.3 ± 2.25 ; biotina 10 nm, 85.8 ± 2.0 y biotina 100 nM, 85.5 ± 2.1 ; $p < 0.005$) y a los 120 minutos se observa mayor reacción acrosomal (control, 67.3 ± 2.25 ; biotina 10 nM, 92.8 ± 0.79 ; biotina 100 nM, 95.6 ± 1.9 ; $p < 0.0005$).

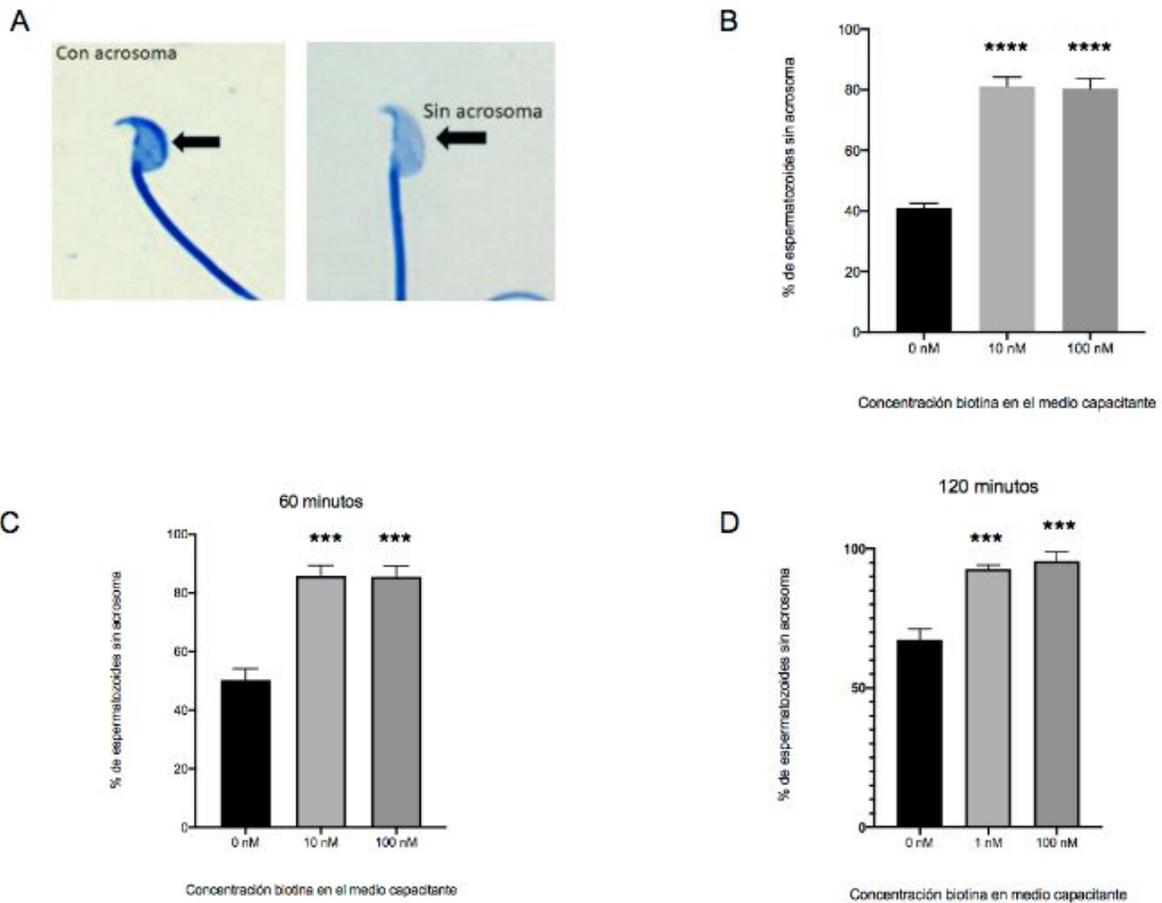


Fig.13 La adición de biotina al medio capacitante estimula la reacción acrosomal temprana en los espermatozoides de ratón. (A) Fotografía de una cabeza de espermatozoide de ratón con acrosoma (izquierda) y una sin acrosoma (derecha) tras una tinción utilizando azul de Coomassie. (B) Porcentaje de espermatozoides capacitados sin acrosoma (* $p < 0.0001$) después de 30 minutos de incubación. (C) Porcentaje de espermatozoides capacitados sin acrosoma (** $p < 0.005$) al término de 60 minutos. (D) Porcentaje de espermatozoides capacitados sin acrosoma (** $p < 0.0005$) al término de 120 minutos.

7.4 EFECTO DE LA BIOTINA SOBRE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Para determinar el efecto de la biotina sobre la motilidad espermática, se incubaron espermatozoides en medio capacitante M16 adicionado con biotina a concentraciones 10 nM y 100 nM. Posteriormente, utilizando un microscopio óptico y una cámara de

Neubauer se cuantificó el número de espermatozoides que presentaron motilidad progresiva (MP), motilidad no progresiva (MNP) y aquellos que no se movían (IM).

Al término de 30 minutos de incubación con biotina, se registró una disminución en la motilidad progresiva de los espermatozoides respecto al control (control, 70.5 ± 3.3 ; biotina 10 nM, 47.2 ± 3.4 ; biotina 100 nM, 40 ± 4 ; $p < 0.0006$), sin embargo, la motilidad no progresiva no presentó diferencias significativas entre los tres grupos (control, 13.25 ± 4.3 ; biotina 10 nM, 29 ± 2.5 ; biotina 100 nM, 22.2 ± 2.2 ; $p < 0.0196$). Respecto al número de células que no presentaron movimiento, se registró una diferencia significativa únicamente respecto al grupo con concentración 100 nM de biotina (control, 13.5 ± 2.0 ; biotina 10 nM, 27.5 ± 6.6 ; biotina 100 nM, 38.25 ± 2.0 ; $p < 0.0074$).

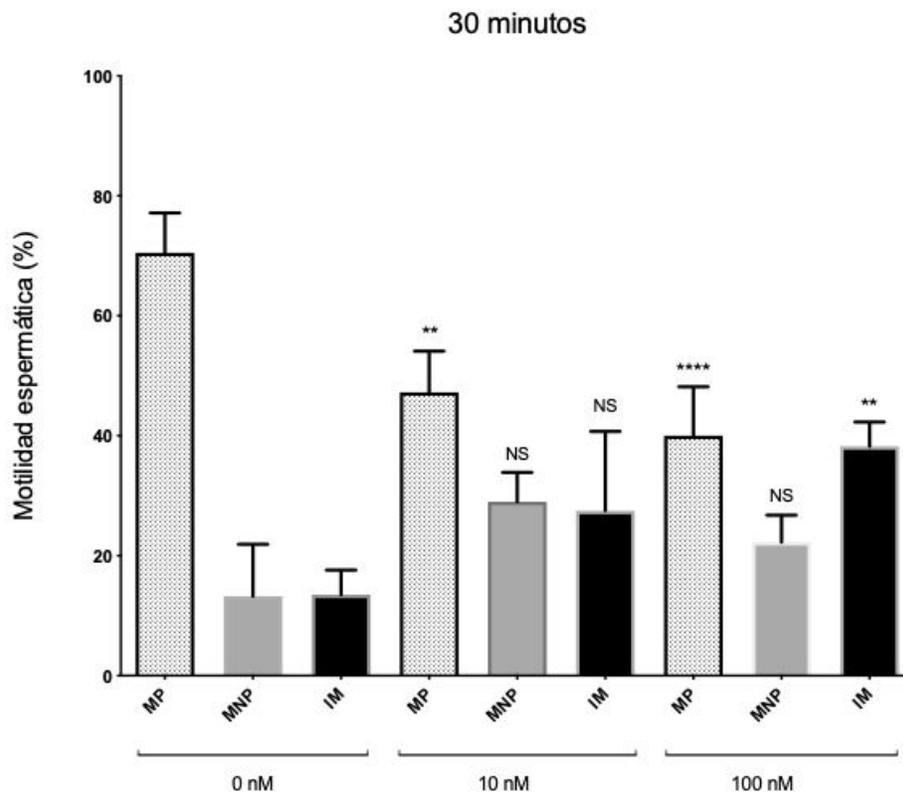


Fig. 14 La adición de biotina al medio capacitante altera la motilidad espermática en ratones. Porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo (MP) ($*p < 0.0006$); movimiento no progresivo (MNP) ($p < 0.0196$) o inmóviles (IM) ($p < 0.0074$) tras 30 minutos de incubación en medio capacitante M16 sin biotina (0 nM) o en presencia de biotina (10 y 100 nM).

Después de 60 minutos de incubación en condiciones capacitantes, se registró una importante pérdida de la motilidad progresiva para los espermatozoides incubados en presencia de biotina (control, 83.2 ± 3.5 ; biotina 10 nM, 32.7 ± 1.4 ; biotina 100 nM, 15.2 ± 0.47 ; $p < 0.001$), así como un aumento significativo del número de gametos inmóviles (control, 12.2 ± 6.1 ; biotina 10 nM, 53.5 ± 4.8 ; biotina 100 nM, 75.7 ± 2.5 ; $p < 0.0001$). Una vez más no se observaron diferencias significativas para la motilidad no progresiva entre los tres grupos (control, 7 ± 1.7 ; biotina 10 nM, 13 ± 2.8 ; biotina 100 nM, 9 ± 2.7 ; $p < 0.2768$).

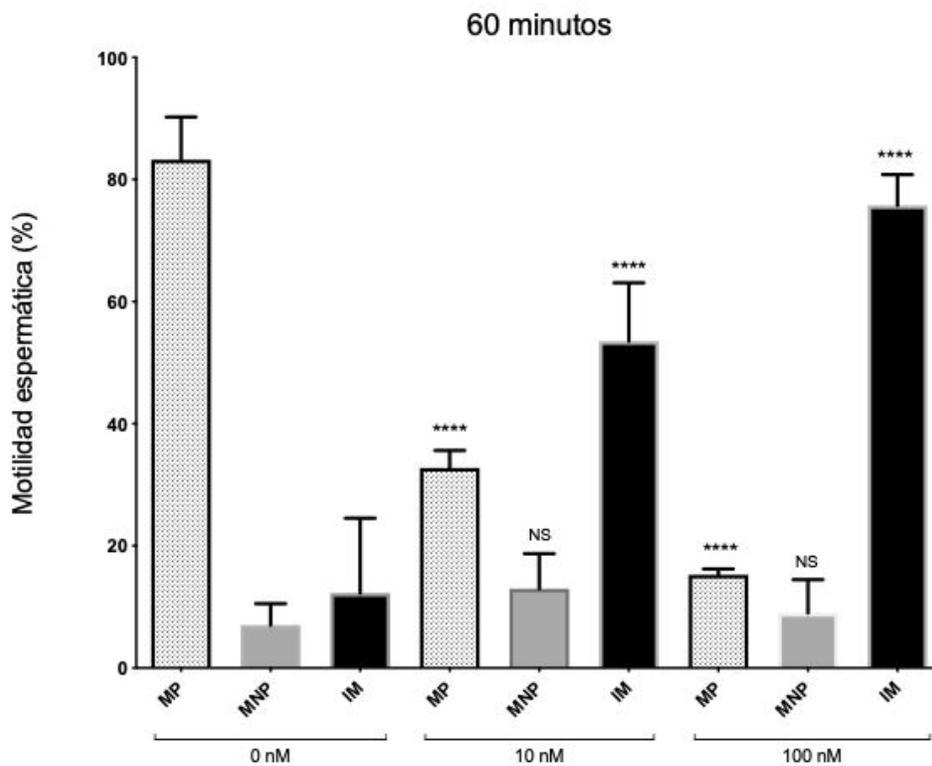


Fig. 15 La adición de biotina al medio capacitante altera la motilidad espermática en ratones. Porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo (MP) ($*p < 0.001$); movimiento no progresivo (MNP) ($p < 0.2768$) o inmóviles (IM) ($*p < 0.0001$) tras 60 minutos de incubación en medio capacitante M16 sin biotina (0 nM) o en presencia de biotina (10 y 100 nM).

Al término de 120 minutos, la motilidad progresiva de los espermatozoides incubados en presencia de biotina disminuyó significativamente respecto al grupo control (control, $51 \pm$

2.43; biotina 10 nM, 19.5± 5.58; biotina 100 nM, 9± 2.0; p<0.0001). Las diferencias en el movimiento no progresivo entre los tres grupos no fue significativa al igual que en los dos tiempos pasados (contro, 13.5± 1.98; biotina 10 nM, 13.13± 0.81; 100 nM, 8.62± 1.98; p<0.0007). Contrariamente, el porcentaje de espermatozoides sin motilidad aumentó significativamente respecto al control (control, 34.75± 2.14; 10 nM, 67.38± 5.73; 100 nM, 82.38± 3.9; p<0.0001).

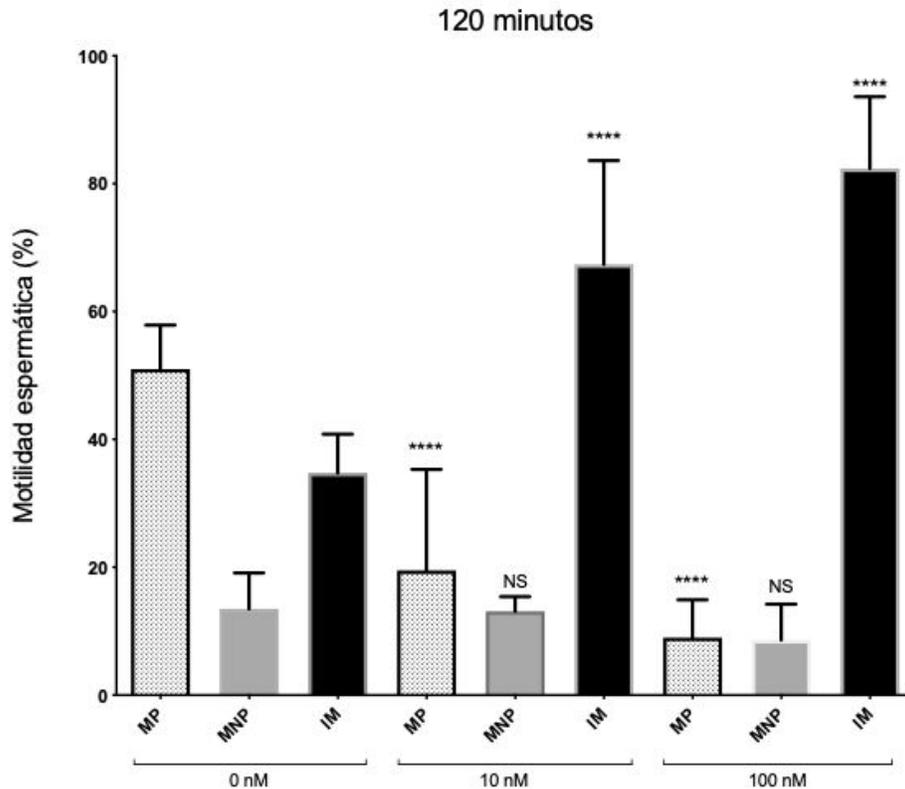


Fig. 16 La adición de biotina al medio capacitante altera la motilidad espermática en ratones. Porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo (MP) (*p<0.0001); movimiento no progresivo (MNP) (p<0.0007) o inmóviles (IM) (*p<0.0001) tras 120 minutos de incubación en medio capacitante M16 sin biotina (0 nM) o en presencia de biotina (10 y 100 nM).

8. DISCUSIÓN

Para poder lograr una fertilización exitosa *in vitro*, deberán fosforilarse algunas proteínas en residuos de tirosina del flagelo del espermatozoide durante el proceso de capacitación, lo anterior resulta en un movimiento hiperactivado de la célula, que le conferirá el movimiento y fuerza para atravesar el cumulus oophorus. Es importante que hasta esta etapa el espermatozoide presente una morfología normal y un acrosoma intacto para que pueda liberar las enzimas contenidas en éste únicamente al entrar en contacto con la zona pelúcida del ovocito, de lo contrario la motilidad de la célula estaría comprometida y no sería posible la fertilización. Uno de los retos en las técnicas de fertilidad asistida, es lograr hiperactivar a los espermatozoides al ser capacitados *in vitro*, sin que se altere el orden de eventos previos a la fertilización ni que el agente activador comprometa la integridad del gameto o el desarrollo del cigoto que se formará.

En trabajos relacionados con fecundación *in vitro* se han utilizado ampliamente activadores de motilidad espermática entre ellos, inhibidores de la fosfodiesterasa (IPDE) como la epinefrina (Cornett et Meizel, 1978) y la cafeína (Barakat et al, 2015), la hipotaurina que actúa como inhibidor de las especies de oxígeno reactivo (Donnelly et al, 2000), y de manera experimental a la vitamina biotina (Kalthur et al, 2012). Existe poca información en la literatura sobre el uso de la biotina. Kalthur et al. reportaron en el 2012 sobre la capacidad de la biotina para intensificar la motilidad en espermatozoides humanos, pero sin reportar antecedentes sobre los efectos en la morfología y fertilidad. Más adelante, en otra investigación (Salian et al., 2019), los mismos autores presentaron datos utilizando una única dosis de 10 nM de biotina en un modelo de ratón, reportando un efecto positivo en la fertilización, sin mostrar los efectos de esta vitamina sobre la morfología del espermatozoide ni los efectos que esta tiene sobre la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina.

En el presente estudio se utilizó como modelo experimental el ratón. Este modelo nos permitió determinar el efecto que tiene la biotina añadida a un medio capacitante sobre eventos previos al proceso de fertilización tales como la capacitación y la reacción acrosomal, así como sobre la motilidad espermática. Específicamente, determinamos el efecto que tiene la adición de biotina al medio capacitante sobre la fosforilación de

proteínas en residuos de tirosina, la reacción acrosomal, la morfología y la motilidad del espermatozoide.

Los datos obtenidos en este trabajo muestran que la biotina a una concentración de 10 nM aumenta la fosforilación en residuos de tirosina en proteínas ubicadas en la cabeza y flagelo del espermatozoide a los 30, 60 y 120 minutos de capacitación respecto a los capacitados en ausencia de biotina, esto puede traducirse en un aumento de la motilidad hiperactivada, que significaría una ventaja para lograr la fertilización. Sin embargo, a esta misma concentración la biotina induce cambios morfológicos que pueden impedir que el espermatozoide se desplace de manera efectiva hacia el óvulo y aunado a esto, indujo a una reacción acrosomal temprana, evento que conduce a una disminución del movimiento flagelar. Todo lo anterior se reflejó en una disminución de la motilidad progresiva y un aumento del porcentaje de espermatozoides inmóviles.

Los espermatozoides capacitados en presencia de biotina a una concentración 100 nM mostraron un incremento de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina al término de una hora, pero esta misma dosis a dos horas mostró una disminución drástica de este tipo de fosforilación, esto tiene repercusiones en los espermatozoides haciéndolos inmóviles. Adicionalmente, a una concentración de 100 nM la biotina provocó cambios morfológicos y una reacción acrosomal temprana. El tipo de cambios morfológicos que se observaron fueron doblamientos en pieza media, enroscamiento del flagelo, daño a la cabeza, interrupción de la continuidad del flagelo, desprendimiento de la cabeza y combinaciones de los anteriores. Se observó una disminución significativa del movimiento progresivo y un aumento del número de espermatozoides inmóviles respecto al control.

La morfología del espermatozoide es uno de los factores examinados como parte del análisis de semen para evaluar la infertilidad masculina al realizar una selección artificial (WHO, 2010) y es uno de los criterios de selección que ejerce el tracto genital femenino de forma natural. Daños en la morfología del espermatozoide se traducen en alteraciones de la motilidad del espermatozoide. Los daños al flagelo comprometen la habilidad del espermatozoide para desplazarse y por lo tanto de completar su trayectoria a través del tracto genital femenino y atravesar el cumulus oophorus. Específicamente modificaciones a la pieza media podrían estar directamente involucrados con alteraciones del metabolismo energético, pues en esta región se encuentra la vaina mitocondrial- centro energético de la célula. Daños a la cabeza significan pérdida del acrosoma y de manera

más importante un daño potencial al material genético que se encuentra resguardado en el núcleo situado en esta región. Respecto a la reacción acrosomal temprana, la exocitosis prematura del contenido enzimático situado en esta vesícula significa la pérdida de la capacidad de poder atravesar la zona pelúcida compuesta de glicoproteínas y ácido hialurónico que rodean al ovocito. La exocitosis prematura del acrosoma también resulta en una pérdida gradual del movimiento flagelar.

Los estudios realizados por Salian et al. (2019) reportan un aumento de la motilidad espermática en humanos y un mayor potencial fertilizante en ratones al adicionar biotina (10 nM) al medio capacitante. El contraste de estos datos con los resultados aquí reportados pueden deberse a una diferencia de sensibilidad a esta vitamina entre ambas especies o a alguna de las siguientes diferencias:

a) Los espermatozoides de humanos utilizados en los estudios de Salian et al. (2019) habían sido recuperados del eyaculado y criopreservados. Tras la descongelación se seleccionaron aquellos que presentaban movimiento a través de una técnica denominada *swim up* y la capacitación se realizó en el medio EBSS (Earle's Balanced Salts). Cabe destacar que el proceso de capacitación de los humanos toma entre 3 y 24 horas para llevarse a cabo.

b) Los espermatozoides de ratones utilizados para este estudio se recuperaron de la cauda del epidídimo y el conducto deferente. Los espermatozoides no fueron congelados ni sometidos a ningún tipo de selección artificial, es decir, se utilizó la población completa de células. El tiempo de capacitación del espermatozoide de ratón es de entre 1 y 2 horas.

A la luz de los contrastes entre ambos estudios, deberá determinarse si utilizar biotina como agente activador de la motilidad espermática podría causar efectos adversos sobre el desarrollo embrionario al haberse llevado a cabo una fertilización con espermatozoides bajo condiciones estresantes, o si estas condiciones podrían significar un tipo de selección de forma que únicamente los espermatozoides más resistentes logren fusionarse con el óvulo.

Los hallazgos del presente estudio alertan sobre los efectos de la biotina en la integridad estructural-funcional de los espermatozoides durante el proceso de capacitación *in vitro*, en particular porque la biotina es una vitamina hidrosoluble que actualmente se vende sin regulación alguna para uso cosmético y como agente coadyuvante para el tratamiento de

enfermedades como la diabetes. Los resultados obtenidos en el presente trabajo aunados a las observaciones en estudios previos (Pastén-Hidalgo et al, 2019; Riverón-Negrete et al, 2016, Tixi-Verdugo, 2018) han encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina modifican la estructura de diversos tejidos, y advierten contra el uso de esta vitamina como agente activante de la motilidad espermática.

9. CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados expuestos en el presente trabajo demuestran que la biotina a dosis nanomolares (10 y 100 nM) aumenta en los espermatozoides de ratón alteraciones morfológicas en la cabeza y el flagelo, los niveles de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y desencadena una reacción acrosomal temprana durante el proceso de capacitación *in vitro*.

10. PERSPECTIVAS

A continuación se mencionan posibles estudios futuros para lograr un mayor entendimiento respecto al efecto de la biotina sobre el espermatozoide:

a) Análisis con sistema CASA. Este sistema de análisis seminal computarizado permitirá determinar con precisión los siguientes parámetros: motilidad, morfología, fragmentación del ADN, vitalidad y reacción acrosomal. Determinar todo lo anterior para ambos tipos de espermatozoides, sin haber sido criopreservados previamente, permitirá establecer la diferencia entre los efectos de esta vitamina sobre cada uno de los parámetros mencionados, incluyendo posibles daños al material genético.

b) Análisis del semen de individuos suplementados con biotina. Realizar estudios (*in vivo*) sobre los espermatozoides provenientes del eyaculado de hombres recibiendo tratamientos con biotina completará un esquema en el que se tiene datos sobre el efecto de esta vitamina sobre los espermatozoides de ratones en sistemas *in vivo* e *in vitro*, pero que para humanos sólo se han reportado efectos en condiciones *in vitro*.

c) Estudios de microscopía electrónica. El uso de un microscopio electrónico permitirá determinar qué estructuras se dañan en el espermatozoide de ratón al ser incubado en presencia de biotina.

d) Análisis de las concentraciones de biotina en mujeres utilizando suplementos de dicha vitamina. Específicamente, determinar la concentración de biotina en el tracto genital femenino de aquellas mujeres utilizando suplementos de biotina.

e) Análisis del desarrollo embrionario. Es de fundamental importancia monitorear el desarrollo de embriones formados a partir de espermatozoides incubados en presencia de biotina de forma que se garantice que no habrá daños para el futuro organismo.

11. ANEXOS

Solución isotónica NaCl 0.154 M (500 ml)

Diluir en 500 mL de agua destilada:

<input type="checkbox"/> NaCl	4.5 g
-------------------------------	-------

Filtrar. Conservar a 4°C.

PBS 10X (1000 ml) pH 7.4

Diluir en 800 ml de agua bidestilada:

Cloruro de Sodio NaCl 0.14 M

Fosfato de Potasio Monobásico KH_2PO_4 1.5 mM

Fosfato de Sodio Dibásico 7•hidrato $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.1 M

Cloruro de Potasio KCl 2.7mM

Ajustar pH a 7.4. Conservar a 4°C.

PBS-Tritón X 100 al 0.1%

Mezclar los siguientes reactivos:

<input type="checkbox"/> PBS 1X	99.9 ml
<input type="checkbox"/> Tritón X-100	0.1 ml

Conservar a 4°C.

TBS 10X pH 7.4 (1 L)

Diluir en 800 ml de agua bidestilada:

<input type="checkbox"/> Tris base	24.2 g
<input type="checkbox"/> NaCl	80 g

Aforar a 1L. Ajustar pH a 7.4. Conservar a 4°C.

TBST 0.05% (100 ml)

Adicionar en 100 ml de TBS 1X:

<input type="checkbox"/> Tween 20	50µl
-----------------------------------	------

Conservar a 4°C.

Gel separador 10% (10 ml)

Mezclar los siguientes reactivos:

<input type="checkbox"/> Agua bidestilada	4 ml
<input type="checkbox"/> Acrilamida al 30%	3.3 ml
<input type="checkbox"/> Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 ml
<input type="checkbox"/> SDS al 10%	0.1 ml
<input type="checkbox"/> APS al 10%	0.1 ml
<input type="checkbox"/> TEMED	0.006 ml

Gel Concentrador 5% (4 ml)

Mezclar los siguientes reactivos:

<input type="checkbox"/> Agua bidestilada	2.7 ml
<input type="checkbox"/> Acrilamida al 30%	0.67 ml
<input type="checkbox"/> Tris 1 M pH 6.8	0.5 ml
<input type="checkbox"/> SDS al 10%	0.04 ml
<input type="checkbox"/> APS al 10%	0.04 ml
<input type="checkbox"/> TEMED	0.004 ml

Solución de monómeros de acrilamida al 30% (100ml)

Disolver en 80 ml de agua bidestilada:

<input type="checkbox"/> Acrilamida	29 g
<input type="checkbox"/> Bis-acrilamida	1 g

Aforar a 100 ml con agua bidestilada.
Conservar a 4°C en oscuridad.

Lauril sulfato de sodio (SDS) 10% (100ml)

Diluir en agua bidestilada:

SDS 10 g

Aforar a 100 ml con agua bidestilada.
Guardar a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio (APS) 10% (1 ml)

Diluir en 1 ml de agua bidestilada:

Persulfato de amonio 0.1 g

Conservar a 4°C.

Tris 1.5 M pH 8.8 (500 ml)

Diluir en 300 ml de agua bidestilada:

Tris base 91 g

Ajustar pH a 8.8. Aforar a 500 ml. Filtrar.
Conservar a 4°C.

Tris 1 M pH 6.8 (200 ml)

Diluir en 100 ml de agua bidestilada:

Tris base 24.22 g

Ajustar pH a 6.8. Aforar a 200 ml. Filtrar.
Conservar a 4°C.

Buffer de Laemmli 2X pH 6.8 (10 ml)

SDS 1 g
 Glicerol al 20% 3 ml
 Tris 100 mM pH 6.8 1 ml
 Azul de bromofenol 0.02 g

Aforar con agua bidestilada a 10 ml. Conservar a -20°C.
Adicionar β-mercaptoetanol al 10% al momento de utilizar.

Buffer de corrida 5X (1 L)

Diluir en agua bidestilada:

<input type="checkbox"/> Tris Base	15.1 g
<input type="checkbox"/> Glicina	94 g
<input type="checkbox"/> SDS al 10%	50 ml

Aforar a 1 L con agua bidestilada.
 Guardar a 4°C. Usar un máximo de cuatro veces.

Buffer de transferencia 1X (1L)

Diluir en agua bidestilada:

<input type="checkbox"/> Tris Base	3.03 g
<input type="checkbox"/> Glicina	14.4 g
<input type="checkbox"/> Metanol	200 ml

Aforar a 1L con agua bidestilada. Preparar en el momento.

Solución de bloqueo para WB (100 ml)

Diluir en TBS-T 0.05%:

<input type="checkbox"/> Leche	0.05 g
--------------------------------	--------

Solución fijadora de formaldehído al 3%

Del Formaldehído al 36% se tomarán 8.3 mL para obtener una concentración al 4%
 Se afora a 100 mL con PBS 1X

Cloruro de amonio 50 mM (50 ml)

Diluir en 50 ml de PBS 1X:

<input type="checkbox"/> NH ₄ Cl	0.1337 g
---	----------

Filtrar. Conservar a temperatura ambiente.

Medio capacitante

Medio M16 con bicarbonato y ácido láctico
 Sigma. Número de catálogo: M7292

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., Chyatte, M. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 13: 37.
2. Aguilera-Méndez, A., Fernández-Mejía, C. (2012). The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels for cGMP and AMPK activacion. *Biofactors.* 38(5):387-94.
3. Báez-Saldaña, A., Camacho-Arroyo, I., Espinoza-Aguirre, J.J., Néri-Gómez, T., Rojas-Ochoa, A., Guerra-Araiza, C., Larrieta, E., Vital, P., Díaz, G., Chavira, R., Fernández-Mejía, C. (2009). *Steroids.* Oct;74(10-11):863-9.
4. Barakat, I. A., Danfour, M. A., Galewan, F. A., & Dkhil, M. A. (2015). Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of frozen bovine semen. *BioMed research international*, 2015, 948575. doi:10.1155/2015/948575.
5. Benschoter, C.A. (1967). Effect of dietary biotin on reproduction of the house fly. *J. Econ. Entomol.* 60(5):1326-8.
6. Boone-Villa, D., Aguilera-Mendez, A., Miranda-Cervantes, A. & Fernández-Mejía, C. (2015). Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Adipose Tissue cGMP Concentrations, AMPK Activation, Lipolysis, and Serum-Free Fatty Acid Levels. *J. Med. Food.* 18(10):1150-56.
7. Breitbart, H. & Etkovitz, N. (2011) Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction (Review). *Asian Journal of Andrology.* Jan; 13(1): 106-10.
8. Chavarría-Olarte, M.E. & Reyes-Fuentes, A. (1998) Bioquímica de la capacitación y la reacción acrosomal en los mamíferos. En Velázquez-Moctezuma, J.V. (Ed.), *Biología de la reproducción* (pp. 151-192). Ciudad de México, México: Casa abierta al tiempo.
9. Coggeshall, J.C., Hegggers, J.P., Robson, M.C., Baker, H. (1985). Biotin Status and Plasma Glucose in Diabetics. *Ann. NY Acad. Sci.* 447:389-92.
10. Cohen, E. & Levinson, H.Z. (1968). Disrupted fertility of the hidebeetle *Dermestes maculatus* (Deg.) due to dietary overdosage of biotin. *Experientia.* 24(4):367-8.
11. Cooper, T.G. (2007). Sperm maturation in the epididymis: an new look to an old problem (Review). *Asian J Androl.* Jul;9(4):533-9.
12. Cooper, T.G., & Ching-Hei, Y. (2006) Sperm maturation in the human epididymis. En Barratt, C. (Ed.), *The Sperm Cell* (pp. 72-107). Inglaterra. Cambridge University Press.
13. Cornett, L. E., & Meizel, S. (1978). Stimulation of in vitro activation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa by catecholamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(10), 4954–4958. doi:10.1073/pnas.75.10.4954.
14. Daryabari, H., Akhlagi, A., Zamiri, M.J., Mianji, G.R., Pirsaraei, Z.A., Deldar, H., Eghbalian A.N. (2014). Reproductive performance and oviductal expression of avidin and avidin-related protein 2 in young and old broiler breeder hens orally exposed to supplementary biotin. *Poult Sci.* Sep;93(9):2289-95.
15. Donnelly, E.T., McClure, N., Lewis, S.E.M. (2000). Glutathione and hypotaurine *in vitro*: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis.* Jan (15):61–68.

16. Fainberg, J. & Kashanian, J.A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility (Review). doi: 10.12688/f1000research.17076.1.
17. Florman, H.M., Jungnickel, M.K. & Sutton, K.A. (2008). Regulating the Acrosome Reaction (Review). *Developmental Biology*. 52(5-6):503-10.
18. García-Vázquez, F.A., Gadea, J., Matás, C., Holt, W.V. (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals (Review). *Asian J Androl*. 18(6):844–850. Doi:10.4103/1008-682X.186880.
19. Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D.A., & Zoumpourlis, V. (2016). The Molecular Basis of Fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 38(4):(979-986).
20. Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation (Review). *Andrology*, 5(2), 204–218. doi:10.1111/andr.12320.
21. Hassan, Y.I., Zempleni, J. (2008). A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase. *Nutr. Rev. Dec*; 66(12):721-5.
22. Henkel, R., MAAß, G., Bödeker, R. H., Scheibelhut, C., Stalf, T., Mehnert, C., ... Schill, W. B. (2005). Sperm function and assisted reproduction technology. *Reproductive medicine and biology*, 4(1), 7–30.
23. Hernández-Pérez, O., Ballesteros, L.M. (1998). Biología molecular del espermatozoide de mamíferos. En Velázquez-Moctezuma, J.V. (Ed.), *Biología de la reproducción* (pp. 193-222). Ciudad de México, México: Casa abierta al tiempo.
24. Hidalgo-Ordoñez, C.O., Tamargo, M., Díez-Monforte, C. (2005). Análisis del semen bovino. *Tecnología agroalimentaria*. (2): 39-43.
25. Ickowicz, D., Finkelstein, M. & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases (Review). *Asian Journal of Andrology*. Nov (6):816-21.
26. Kalthur, G., Salian, S. R., Keyvanifard, F., Sreedharan, S., Thomas, J. S., Kumar, P., & Adiga, S. K. (2012). Supplementation of biotin to sperm preparation medium increases the motility and longevity in cryopreserved human spermatozoa. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(7), 631–635.
27. Kinal, S., Twardon, J., Bednarski, M., Pres, J., Bodarski, R., Slupczynska, M., Ochota, M., Dejneka, G.J. (2011). *Pol J Vet Sci*. 14(1):103-10.
28. Larson, J.L. & Miller, D.J. (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev*. Apr;52(4):445-9.
29. Lazo de la Vega Monroy, María Luisa (2012). Efectos de la suplementación con biotina sobre el islote pancreático (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
30. Lewis, A.J., Cromwell, G. L., Pettigrew, J.E. (1991) Effects of supplemental biotin during gestation and lactation on reproductive performance of sows: a cooperative study. *J. Anim. Sci*. 69(1):207-14.
31. López-García, M.J., Urbano-Felices, A., Cárdenas-Povedano, M. (2012). *Manual de laboratorio para el análisis del semen*. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.3926/oss.5> .
32. Majee, D.N., Schwab, E.C., Bertics, S.J., Seymour, W.M., Shaver, R.D. (2003) Lactation performance by dairy cows fed supplemental biotin and a B vitamin blend. *J Dairy Sci*. Jun; 86(6):2106-12.

33. Mock, D.M. (1991). Skin manifestations of biotin deficiency. *Seminars in Dermatology*. Dec;10(4):296-302.
34. Organización Mundial de la Salud. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.
35. Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D., & Karahuseyinoglu, S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 25(8), 403–411.
36. Pastén-Hidalgo, K., Riverón-Negrete, L., Sicilia-Argumedo, G., Canul-Medina, G., Salazar-Anzures, T., Tapia-Rodríguez, M., Hernández-González, E.O., Roa-Espitia, A.L., Cedillo-Peláez, C. & Fernández-Mejía, C. (2019). Dietary Biotin Supplementation Impairs Testis Morphology and Sperm Quality. *J Med Food*. Oct 29.
37. Pillai, M.K. & Medhukar, B.V. (1969). Effect of biotin on the fertility of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L). *Naturwissenschaften*. 56(4): 218-9.
38. Reid, A. T., Redgrove, K., Aitken, R. J., & Nixon, B. (2011). Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction (Review). *Asian journal of andrology*, 13(1), 88–96. doi:10.1038/aja.2010.74.
39. Revilla-Monsalve, C., Zendejas-Ruiz, I., Islas-Andrade, S., Baez-Saldaña, A., Palomino-Garibay, M.A., Hernández-Quiroz, P.M., Fernández-Mejía, C. (2006). Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertiglyceridemia. *Biomed. Pharmacother*. 60(4): 182-5.
40. Riverón-Negrete, L., Fernández-Mejía, C. (2017). Pharmacological Effects of Biotin in Animals. *Mini Rev Med Chem*. 17 (6): 529-540.
41. Salian, S.R., Nayak, G., Kumari, S., Patel, S., Gowda, S., Shenoy, Y., Sugunan, S., G.K.R., Managuli, S.R., Mutalik, S., Dahiya, V., Pal, S., Adiga, S.K., Kalthur, G. (2019). Supplementation of biotin to sperm preparation medium enhances fertilizing ability of spermatozoa and improves preimplantation embryo development. *J Assist Reprod Genet*. Feb; 36(2):255-266.
42. Simmins, P.H., Brooks, P.H. (1983). Supplementary biotin for sows: effect on reproductive characteristics. *Vet Rec*. Apr. 112(18):425-9.
43. Sutovsky, P., Gaurishankar, M. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. En Christopher J. (Ed.) *The Sperm Cell* (pp. 1-30). Cambridge, Inglaterra. Cambridge University Press.
44. Urner, F. & Sakkas, D. (2003). Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction*. Jan 125(1):17-26.
45. Valenciano, A., Mayordomo, R., de la Rosa E.J., Hallböök, F. (2002). Biotin decreases retinal apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo. *Neuroreport*. Mar 13(3):297-9.
46. Wassarman, P.M. (1999). Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis and Fusion (Review). *Cell*. 96:175-183.
47. Vilches-Flores, A., Fernández -Mejía, C. (2005). Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Revista de investigación clínica*. 57(5):716-24.
48. Vilches-Flores, A., Tovar, A.R., Marín-Hernández, A., Rojas-Ochoa, A., Fernández-Mejía, C. (2010). Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and

- autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J. Nutr. Biochem.* Jul; 21(7):606-12.
49. Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121: 1129-1137.
 50. Visconti, P.E. & Kopf, G.S. (1998). Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation (Review). *Biol Reprod.* Jul;59(1):1-6.
 51. Wang, J., & Sauer, M. V. (2006). In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutics and clinical risk management*, 2(4), 355–364. doi:10.2147/tcrm.2006.2.4.355.
 52. Watanabe-Kamiyama, M., Kamiyama, S., Horiuchi, K., Ohinata, K., Shirakawa, H., Furukawa, Y., Komai, M. (2008). Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.* 99(4): 756-63.
 53. Yates, A.A., Schlicker, S.A., Suitor, C.W. (1998). Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. *J. Am. Diet. Assoc.* Jun;98(6): 699-706.
 54. Zempleni, J., & Mock, D.M. (1999). Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:504-08.
 55. Zempleni, J., & Mock, D. M. (2000). Marginal Biotin Deficiency is Teratogenic (44458). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223(1), 14–21.
 56. Zempleni, J., Wijeratne, S. S., & Hassan, Y. I. (2009). Biotin (Review). *BioFactors (Oxford, England)*, 35(1), 36–46. doi:10.1002/biof.8.