



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL ÁNGELES PEDREGAL

Presencia de Claudina-1 en espermatozoides obtenidos por eyaculado y su relación con el desarrollo embrionario en ciclos de reproducción asistida.

TESIS

Que para obtener el título de:
ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.

PRESENTA

ANTONIO GARCÍA LUNA VÁSQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Héctor Salvador Godoy Morales

Director de Tesis.

Hospital Ángeles Pedregal.

ASESOR METODOLÓGICO DE TESIS

Dr. José Manuel Lozano Sánchez

Asesor Metodológico de Tesis.

Hospital Ángeles Pedregal.



2017

CD.MX.



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.

Presencia de Claudina-1 en espermatozoides obtenidos por eyaculado y su relación con el desarrollo embrionario en ciclos de reproducción asistida.

García-Luna-Vásquez Antonio¹, Godoy-Morales Héctor-Salvador², Lozano-Sánchez José-Manuel³

- 1- Médico Residente de la Especialidad de Biología de la Reproducción Humana, Hospital Ángeles Pedregal.
- 2- Profesor Titular del Curso en Especialización en Biología de la Reproducción Humana, Director de Tesis y Asesor Clínico, Hospital Ángeles Pedregal.
- 3- Asesor Metodológico de Tesis, Hospital Ángeles Pedregal.

Correspondencia:

Antonio García Luna Vásquez, MR.

Hospital Ángeles Pedregal: Unidad de Medicina Reproductiva.

Camino a Sta. Teresa 1055-Cons. 129.

Colonia Héroes de Padierna.

Código Postal: 10700

Ciudad de México.

Correo electrónico: antonioglv@hotmail.com

Índice.

1- Resumen	4
2- Abstract	6
3- Introducción	8
4- Materiales y Métodos	13
5- Resultados	17
6- Discusión y Conclusiones	21
7- Bibliografía	22

Resumen.

Introducción:

El proceso de espermatogénesis y espermiación abarca proteínas de unión estrecha involucradas con la finalización del proceso de fertilización. Estudios recientes sugieren que Claudina-1 juega un papel importante en las uniones estrechas entre las células de Sertoli y los espermatozoides en formación.

Objetivo:

Demostrar la presencia de la proteína de unión estrecha Claudina-1 en el esperma humano a través de muestras de eyaculado de hombres de parejas infértiles. Determinar el lugar de expresión de esta proteína en el espermatozoide y relacionar su presencia con el desarrollo embrionario y la fertilización.

Métodos:

Se obtuvieron muestras de semen a través de masturbación en el día de la captura ovular de la pareja. Las muestras se evaluaron con los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (WHO) 2010. La presencia de Claudina-1 se demostró por citometría e inmunohistoquímica.

Resultados:

Se han estudiado 10 muestras de semen de parejas con infertilidad y en ciclos de reproducción asistida. Las muestras de semen destinadas a este estudio fueron procesadas con anticuerpos anti-Claudina-1 para poder detectar su presencia por citometría. Se evaluaron las células espermáticas con fluoroscopia buscando la expresión de Claudina-1. Se ha detectado la expresión de Claudina-1 en las muestras de 2 sujetos, por lo que nuestro estudio demuestra que Claudina-1 puede expresarse en los espermatozoides.

Conclusiones:

La expresión de Claudina-1 en espermatozoides debe jugar un papel importante durante el proceso de fertilización y desarrollo embrionario. La adecuada concentración de estas proteínas modula la organización de proteínas del citoesqueleto, contribuyendo a la migración de centrómeros y a la activación de varios procesos claves relacionados con el desarrollo del embrión. La búsqueda de esta proteína como marcador puede servir como una herramienta pronóstico en ciclos de reproducción asistida.

Abstract.

Introduction.

Spermatogenesis and spermiation involve tight junction proteins that finish fertilization. Recent preliminary studies suggest that Claudin-1 is involved with sperm and Sertoli cells connections.

Objective:

To demonstrate the presence of tight junction (claudin-1) protein at human sperm in the ejaculated sample of men of infertile couples, and determine location of expression.

Methods:

Semen samples were obtained by masturbation at the day of the couple's oocyte retrieval, and used for fertilization analysis with WHO 2010 parameters. Claudin-1 expression was evaluated by immunohistochemistry and cytometer.

Results:

We studied 10 semen samples of couples with infertility in stimulation cycle; these were divided in two: one for fertilization and the other was marked with Claudin-1 antibodies by immune assay in order to verify the presence of Claudin-1 by cytometer. The sperm cell was evaluated with fluoroscopy for the expression of Claudin-1. Body distribution concentrated primary at the middle piece, with only two of five patients expressing Claudin-1 (40%). Our study confirms that Claudin-1 can be expressed by sperm cells obtained by ejaculate.

Conclusions:

Our results suggest that spermatogenesis and spermiation processes are primordial for obtaining functional sperm cells. Expression of tight junctions markers like Claudin-1 could be key for the interaction between oocyte and functional sperms. Tight junctions proteins might modulate cytoskeletal proteins, contributing with centrosomes migration and correct activation of various processes related to fertility.

Introducción.

La familia de proteínas Claudina son importantes moléculas de unión estrecha [1]. Las uniones son dominios membranales altamente especializados cuya principal función es mantener las células adyacentes lo suficientemente cerca para impedir el tránsito libre de pequeñas moléculas, microorganismos y de células a través del espacio para-celular [2]. Las uniones estrechas también son cruciales en la organización de la vía trans-celular, debido a que participa en la polarización de la membrana plasmática epitelial en los dominios apical y baso-lateral distintivamente constitutivos. La distribución polarizada de los canales iónicos, las bombas, y las enzimas en el dominio apical y baso-lateral es responsable de la naturaleza vectorial del transporte trans-epitelial. Ya que las uniones estrechas forman los límites entre estos dominios membranales, también se puede pensar que funciona como una “cerca” en la membrana plasmática [3]. Las uniones estrechas adhieren a las células unas con otras a nivel de las membranas laterales en un complejo de uniones inter-celulares. El más apical de estos es la *zona occludens* [3-4]. La unión estrecha aparece como una serie de aposiciones entre las hojillas exocitoplasmáticas de las membranas laterales de células adyacentes. Estas aposiciones se extienden en una red estilo cinturón que rodea a cada célula y la adhiere a su célula vecina para formar un sello continuo [4].

Las claudinas son proteínas integradas a membrana ubicadas en las uniones estrechas de todos los epitelios y endotelios. Fueron identificadas por primera vez en 1998 en una fracción purificada de la membrana plasmática de hígado de pollo por Furuse [5]. Se piensa que existen 27 genes de claudinas en mamíferos. No todos estos genes se pueden encontrar en todas las especies de mamíferos. Por ejemplo, Claudina-23 está presente en roedores pero no existe en humanos, por lo que ahora hay evidencia para 26 claudinas humanas [6]. Las proteínas de membrana de la familia Claudina son componentes clave para la función y estructura de las uniones estrechas. Las moléculas de Claudina interactúan una con otra entre las células y probablemente se polimerizan junto con la membrana plasmática como fibrillas para generar haces en las uniones estrechas. Las claudinas contienen cuatro dominios trans-membrana. Occludina y tricelulina, que comprenden otros tipos de proteínas conteniendo cuatro dominios trans-membranas con secuencias de aminoácidos relacionadas, son incorporadas o localizadas muy cerca de los haces de uniones estrechas basados en claudinas [7].

En el epidídimo, las uniones estrechas juegan un rol crítico en la formación de la barrera hemato-epidídimo. La formación y la integridad de esta barrera resulta esencial para el mantenimiento del ambiente luminal del epidídimo, lo que permite la maduración de los espermatozoides [8]. De manera reciente, ha sobresalido suficiente documentación en relación a las proteínas de unión estrecha y la espermatogénesis normal. La evidencia demuestra que la mala regulación de la expresión de Claudina-1 modula la expresión / actividad de MMP-9 y p-ERK para inducir la señalización Notch, favoreciendo condiciones inflamatorias y hiperplasia [9]. Sin embargo, existe información limitada respecto a la regulación de la barrera hemato-epididimaria y las uniones estrechas.

Debido a la asociación entre claudinas y uniones estrechas, uno no se atrevería a pensar que las claudinas podrían expresarse en regiones celulares ausentes de uniones estrechas. No obstante y de manera sobresaliente, algunos estudios demostraron que las claudinas pueden expresarse sin la necesidad de uniones estrechas. Un estudio realizado por Gregory et. al en los epidídimos de ratas demostró que Claudina-1 también se encuentra presente a lo largo de las membranas plasmáticas laterales entre células principales en áreas distales a las uniones estrechas, así como entre células principales y basales, donde las uniones estrechas se encuentran ausente. Esto sugiere que Claudina-1 no se halla localizada exclusivamente a las uniones estrechas [10].

Metaloproteasas en la Fisiología Testicular.

El testículo es un órgano altamente dinámico, compuesto principalmente de dos compartimientos mayores: el intersticio, con las células esteroideogénicas de Leydig, y los túbulos seminíferos. Los túbulos seminíferos están rodeados por células peritubulares. Los túbulos están compuestos de células de Sertoli y células germinales en diferentes estadios de desarrollo. Las células de Sertoli juegan un papel clave en la espermatogénesis. Son las células blanco de la Hormona estimuladora de folículos (FSH) y testosterona, responsables de la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis. Estas células forman los túbulos y proveen soporte estructural y nutricional a las células germinales en desarrollo [11].

Un número importante de procesos que regulan la actividad y el destino de muchas proteínas son estrictamente dependientes en eventos proteolíticos. Por ejemplo, las proteasas involucradas en la descamación del ectodominio de proteínas celulares de superficie, la activación o inactivación de citosinas, hormonas y factores de crecimiento, la exposición de neo-proteínas crípticas que exhiben roles de funcionamiento distintos de las moléculas originales, degradación de múltiples componentes de matriz extracelular facilitando la migración e invasión celular. De esta manera, las proteasas son fundamentales en casi todos los procesos complejos de mantenimiento tisular, reparación, crecimiento y desarrollo, y las alteraciones en la estructura y expresión de patrones de proteasas resaltan muchos procesos patológicos, incluidos el cáncer, la artritis, osteoporosis, desórdenes neurodegenerativos y enfermedades cardiovasculares. La terminación de la secuenciación del genoma humano ha permitido la determinación de que más del 2% de todos los genes humanos son para proteasas o inhibidores de proteasas, reflejando la importancia de la proteólisis en la biología humana [12].

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de enzimas degradadoras de matriz extracelular (ECM) que comparten dominios funcionales y mecanismos de activación. Éstas son endopeptidasas Ca^{2+} y Zn^{2+} - dependientes que son activas con pH neutro. Se sintetizan y secretan como pro-enzimas transmembranales y se procesan a una forma activa por la remoción de un pro-péptido amino-terminal. Las MMP pueden ser activadas por agentes caótico-trópicos o por clivaje en el pro-péptido por miembros de la familia de MMP u otras proteasas como el activador de plasminógeno del tipo urocinasa [13].

Claudinas como factores cruciales para el transporte y la barrera epitelial.

La evidencia acerca la contribución funcional de las claudinas a la barrera y el transporte epitelial en tejidos nativos emergió como correlación en la expresión de Claudina con parámetros funcionales como 1- permeabilidad paracelular selectiva en diferentes órganos, 2- análisis de enfermedades hereditarias, y 3- estudios “knock-out” [14-15]. Un número importante de enfermedades humanas hereditarias han sido ligadas a mutaciones aisladas de claudinas: en el riñón, la causa de la hipomagnasemia con hipercalcemia y nefrocalcinosis (FHHNC) ha sido atribuida a mutaciones en el gen que codifica para Claudina-16 y Claudina-19 [16]. Los animales deficientes de Claudina-1 mueren dentro de las primeras horas después del nacimiento debido a deshidratación. La deshidratación está causada

por un incremento dramático en la evaporación del agua a través de la piel, que puede demostrarse por la rápida pérdida de peso [15]. Un estudio adicional demostró que esta deficiencia, de manera específica, termina en disfunción de las uniones estrechas del estrato granuloso [17]. Para la Claudina-5, se ha demostrado que su deficiencia termina en pérdida severa de la barrera hemato-encefálica [18]. De esta manera, las claudinas representan factores determinantes para el funcionamiento de un órgano.

Claudinas formadoras de Barreras versus formadoras de poros.

Cuando se consideran las propiedades de barrera o de canal de ciertas claudinas, se debe mantener en cuenta que todas las claudinas que se insertan en la membrana células e interactúan con claudinas de células adyacentes contribuyen para formar una barrera, si se les compara con la situación de células sin ninguna otra unión estrecha. En este aspecto, todas las claudinas son proteínas formadoras de barreras. Sin embargo, si ya existe una unión estrecha preexistente, entonces las claudinas formadoras de barrera deberían causar un incremento en la resistencia al transporte epitelial, mientras que las claudinas formadoras de poros deberían causar un decremento al insertarse en estas uniones estrechas. De manera consecuente, un golpe a la baja en claudinas formadoras de barrera debería causar un decremento en la resistencia trans-epitelial y un golpe a la baja de una Claudina formadora de poros, un incremento. La formación específica de poros a través de claudinas debe ser distinguido de la formación una fuga para-celular no específica. De este modo, un poro debería incrementar específicamente la permeabilidad para-celular ya sea para moléculas de cierto tamaño o cierta carga eléctrica (o ambas), pero dejar la función de barrera epitelial contra macro-moléculas intacta [4].

Hasta el momento, sólo algunas claudinas han sido clasificadas de manera inequívoca como claudinas formadoras de poros: Claudina-2, -10b y -15 como poros de cationes y Claudina-10^a y -17 como poros de aniones [19].

Presencia de Claudina-1 en el espermatozoide humano.

Hasta el momento, no se encontró en ninguna publicación científica una confirmación de la presencia de la Claudina-1 en el espermatozoide obtenido a través del eyaculado. Este trabajo se propone la caracterización de esta molécula de unión estrecha en el espermatozoide. Como ya ha quedado plasmado a lo largo de este documento, el papel que juegan las claudinas en la reproducción humana es fundamental. Aún se desconocen muchos procesos de la fertilidad, de la unión del espermatozoide con el ovocito, del proceso de clivaje y desarrollo embrionario, y finalmente, de la implantación. El rol que estas moléculas juegan en todos estos procesos aún queda por determinarse en el futuro. No obstante, el confirmar la presencia de esta molécula de unión estrecha en el espermatozoide como célula única y aislada plantea muchas preguntas sobre su papel y función dentro de la fertilización. Muchas claudinas necesitan de su unión con otras moléculas, inclusive otras claudinas, para poder llevar a cabo su función, ya sea como barrera o poro. La comunicación entre el ovocito y el espermatozoide es un fenómeno vital para la sobrevivencia del embrión y su posterior desarrollo adecuado. El caracterizar la presencia de esta molécula en el espermatozoide representa un paso más en el papel que juega el ser humano por descubrir su biología, su química y su propia evolución.

Materiales y Métodos.

Grupo control.

El grupo seleccionado se compuso de parejas infértiles que participaron en técnicas de reproducción asistida en el Hospital Ángeles Pedregal de la Ciudad de México, y que no poseían valores seminales alterados en el seminograma. Todas las muestras fueron frescas y obtenidas por eyaculado. Se evaluó la presencia de Claudina-1 y MMP-14 en las muestras de esperma utilizadas para fertilización y se correlacionó con parámetros seminales, el éxito de la fertilización y el desarrollo embrionario. La fertilización se definió en este caso como la presencia de 2 pronúcleos en los cigotos después de 18-24 horas tras la inseminación. La evaluación de los embriones se llevó a cabo todos los días utilizando la clasificación de Lucinda Veeck.

Grupo de estudio.

El grupo seleccionado se compuso de parejas infértiles que participaron en técnicas de reproducción asistida en el Hospital Ángeles Pedregal de la Ciudad de México, y que poseían al menos un valor alterado en el seminograma. Todas las muestras fueron frescas y obtenidas por eyaculado. Se evaluó la presencia de Claudina-1 y MMP-14 en las muestras de esperma utilizadas para fertilización y se correlacionó con parámetros seminales, el éxito de la fertilización y el desarrollo embrionario. La fertilización se definió en este caso como la presencia de 2 pronúcleos en los cigotos después de 18-24 horas tras la inseminación. La evaluación de los embriones se llevó a cabo todos los días utilizando la clasificación de Lucinda Veeck.

Recolección de las muestras.

Las muestras de semen de 20 varones humanos fueron recolectadas en colaboración con ART Reproducción de la Ciudad de México. Las muestras de estas parejas se dividieron para fertilización y estudio. Se obtuvo un consentimiento informado de todos los participantes y el comité de ética correspondiente aprobó el estudio. Las muestras de semen se obtuvieron a través

de masturbación. El seminograma se clasificó conforme a los parámetros de la Organización Mundial de la Salud 2010 [20].

Medios.

Las suspensiones espermáticas se cultivaron con Hepes modificado, añadido con Etanol-fijo y por pipeteo repetido. Posteriormente, se agregó Fijación y Solución de Permeabilización utilizando BD Cytotfix/Cytoperm™ para la tinción de citosinas intracelulares.

Anticuerpos monoclonales.

Se utilizó un anticuerpo monoclonal secundario de ratón anti-Claudina-1 Catálogo no. 37-4900 Lote No. 905985, obtenido de Invitrogen (New Jersey, USA) y un anticuerpo monoclonal primario de ratón para Metaloproteína-14 (MMP-14) de GeneTex Catálogo No. GTX 73117.

Fijación.

1×10^6 PBS de células lavadas fueron conglomeradas en un tubo de cultivo de 12x75mm. El conglomerado fue re-suspendida en 0.875ml de PBS frío. Después, 0.125ml de solución fría al 2% de paraformaldeído fue añadida y la mezcla se arremolinó inmediatamente. Las muestras fueron incubadas a 4°C por 1 hora y centrifugadas por 5 minutos a 250G. Se decantó la nata superficial.

Permeabilización.

El conglomerado fijo fue re-suspendido gentilmente en 1ml de 0.2% de Tween 20 en PBS a temperatura ambiente. La mezcla fue incubada por 15 minutos a 37°C. 1ml de PBS suplementado con NCS al 2% y NaAz (PBSAz) al 0.1% fue añadido y la suspensión fue mezclada por 5 minutos a 250G. Se decantó la nata superficial. Las muestras fueron procesadas para tinción de DNA o tinción intracelular con anticuerpos monoclonales o anti-suero.

Tinción.

Para la tinción de antígenos de superficie, se incubaron 1×10^6 células en 100 p1 de PBSAz por 30 minutos a 4°C, en la oscuridad con la cantidad de anticuerpos

monoclonales recomendados por el proveedor. En el estudio actual, se usaron 20 pl de cada uno de los siguientes anticuerpos: FITC- y PE-Leu4, FITC- y PE-Leu2a, FITC-Leu3a +b y PE-Leu3a, FITCC- y PE-Leu12. Para la tinción superficial de células NALM-6 1pl de FITC-cabra anti-humano fue utilizado. La tinción de superficie en células CEM se realizó al bloquear primero las uniones no específicas con pre-incubación con 50pl de PBSAz, seguido de 30 minutos de incubación a 4°C. Esta cantidad de FITC-Leu4 fue igualada con la cantidad usada para tinción interna, y se determinó antes que era suficiente para la detección certera de superficie CD3 en esta línea celular. Después de 2 lavados con PBSAz, las células conglomeradas fueron re-suspendidas para análisis en el citómetro de flujo o fijadas para permeabilización, como se describió anteriormente, para tinción interna de DNA o proteínas.

Después de que las células fueron fijadas y permeabilizadas, el DNA se tiñó al incubarse con células en 1ml de PBSAz conteniendo 10pg/ml de PI y 11.25 Unidades de RNasa, por al menos 30 minutos. Las muestras que se encontraban doblemente etiquetadas en su superficie con anticuerpos FITC- y PE- conjugados, el DNA se tiñó con 7-AAD al incubar las células en 1ml de PBSAz conteniendo 25pg/ml de 7-AAF por al menos 30 minutos. Para ambos, PI y 7-AAD, las células se analizaron en sus respectivas soluciones de tinción, usualmente dentro de 2 horas. En ocasiones, las muestras se mantenían por la noche y no mostraron efectos adversos.

La tinción de los antígenos internos se realizó después de fijar y permeabilizar uniones cific. Un total de 5pl (0.25pg) de FITC-Leu4 ó 10pl (0.25pg) de FITC-Leu12 se añadieron en 50pl de PBSAz, seguidos de incubación por 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Cuando la tinción se realizó para la detección de cadenas de inmunoglobulinas en células NALM-6, el paso pre-incubación con HAB fue omitido, y 6pl de una diluación 1:100 (60ng) de FITC-cabra anti-humano ó 6pl de una diluación 1:100 (60ng) de FITC-cabra-humano-6 fue añadido en 100pl de PBSAz seguido de incubación por 30 minutos a 4°C. La cantidad óptima de cada reactivo usado para la tinción interna fue determinado por titulación. Después de 2 lavados en Tween 20 al 0.2%, los conglomerados celulares fueron re-suspendidos en PBSAz y analizados dentro de 2 horas posterior a la tinción. Para almacenaje mayor a la noche, las muestras fueron re-suspendidas en 1% de paraformaldeído.

Citometría de flujo.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro FACScan (Becton Dickinson) equipado con 15mW aire-frío y 488nm láser argón. La fluorescencia verde se

recolectó después de un bandeado a 530130nm con filtro BPI. La detección de PI y emisiones de PE fueron filtradas a través de un filtro BP a 585142nm. La emisión de 7-AAD fue recolectada a través de un filtro de paso largo a 650nm. La compensación electrónica fue utilizada junto con los canales de fluorescencia para remover sobreposiciones espectrales residuales. Las muestras fueron colocadas en ángulo bajo (esparcimiento frontal, FSC) versus ángulo de 90° (esparcimiento lateral, SSC) para excluir los detritos y cúmulos y seleccionar las poblaciones de interés. Un mínimo de 5,000 eventos se recolectaron de cada muestra. Los datos de inmunofluorescencia se proyectaron en una escala logarítmica de 4 dígitos; Las emisiones PI y 7-AAD se recolectaron usando amplificación lineal.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el Software Statistics Package for the Social Sciences, versión 20 (SPSS Inc., Chicago, Il, USA). Las comparaciones de SD entre diferentes grupos se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Las correlaciones entre técnicas fueron valoradas usando el test de Spearman y el análisis ROC se llevó a cabo para obtener la sensibilidad, especificidad y valores de corte para cada prueba. Todas las pruebas estadísticas se realizaron tomando en cuenta el 95% del intervalo de confianza.

Resultados.

Ambos grupos fueron equivalentes en edad. Claudina-1 se identificó de manera positiva en ambos grupos, y de manera incrementada en el grupo control. El grupo de estudio tuvo una correlación positiva con la muestra cpacitada: Edad 0.67 [0.025]. Expresión de claudina-1 no capacitada 0.734 [0.007]. Correlación positiva en la expresión de Claudina-1 en el grupo control: defectos de cola 0.852 [0.015]. Expresión de Claudina-1 no capacitada 0.96 [0.00]. Curva COR determinada a 1080 eventos de citómetro de 20,000 análisis, con paciente alcanzando la etapa embrionaria de blastocisto.

Los resultados demostraron la presencia de Claudina-1 en espermatozoides humanos obtenidos por eyaculado. La expresión se concentró predominantemente en la zona de la cabeza en la región ecuatorial de los espermatozoides por el método de inmunohistoquímica. Se encontraron diferencias de expresión entre capacitados y no capacitados.



Figura-1: Se observa la presencia de Claudina-1 por inmunofluorescencia en un espermatozoide:

**Gráfico Q-Q normal de CAPACITADOCLADN1
para Factor= masculino**

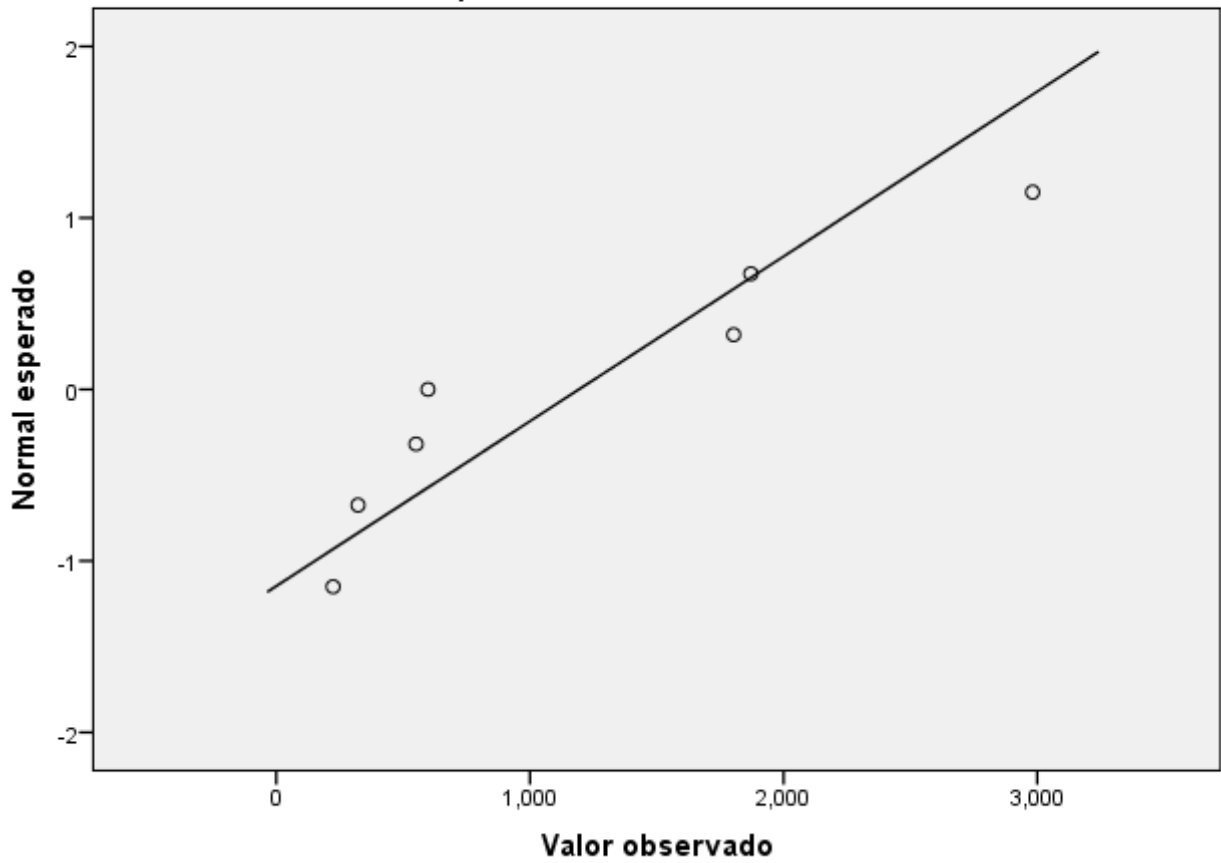
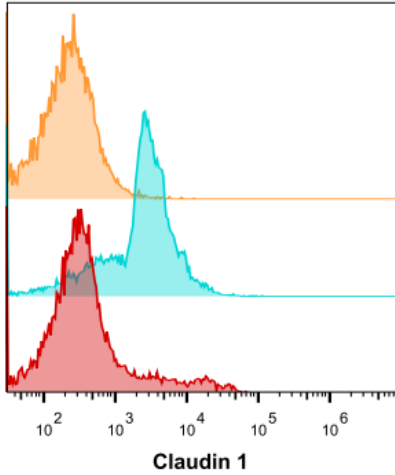
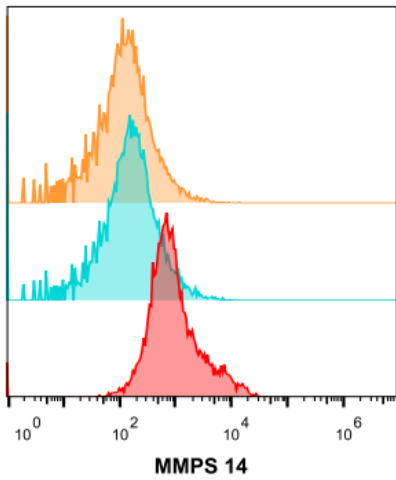


Figura-2: Se muestran los distintos valores de Claudina-1 positivos y el número de eventos que cada uno presentó.



	Sample Name	Count	Geometric Mean : BL1-A
■	Specimen BCO IT-FIX-PERM.fcs	21509	158
■	Specimen 2RIOS IT-FIX-PERM.fcs	21176	1955
■	Specimen CL1-MMP14 IT-FIX-PERM.fcs	21179	363



	Sample Name	Count	Geometric Mean : RL1-A
■	Specimen BCO IT-FIX-PERM.fcs	21509	38.7
■	Specimen 2RIOS IT-FIX-PERM.fcs	21176	62.1
■	Specimen CL1-MMP14 IT-FIX-PERM.fcs	21179	895

Figura-3: Se muestra un ejemplo de una prueba de Claudina-1 positiva.

Discusión y Conclusiones.

La medición de Claudina-1 es una evaluación simple y no invasiva del espermatozoide, que puede ofrecer más información sobre la maduración espermática. El resultado de este estudio abre las puertas a nuevos campos de investigación. A pesar de que la familia de claudinas se conoce desde hace poco más de 15 años, aún falta determinar su importancia y papel en roles más específicos dentro del campo de la medicina y la infertilidad. Uno de los resultados preliminares que arroja este estudio es que la expresión de Claudina-1 en el esperma y más de 1080 eventos en la muestra de semen incrementa la probabilidad de que los embriones alcancen la etapa de blastocisto, de manera independiente a los parámetros seminales. Esto puede traducir una vía funcional para el complejo del citoesqueleto y la organización tubular por los centrosomas alcanzados en la etapa de blastocisto.

Se espera que este estudio pueda servir como un parteaguas para el futuro de la investigación en esta área de la medicina y la infertilidad.

Bibliográfia:

- 1- Suzuki H, Tani K, Tamura A, Tsukita S, Fujiyoshi Y. Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J Mol Biol.* 2015 Jan 30;427(2):291–7.
- 2- Torres-Flores JM, Arias CF. Tight Junctions Go Viral! *Viruses.* 2015 Sep;7(9):5145–54.
- 3- Gumbiner B. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol.* 1987 Dec;253(6 Pt 1):C749–58.
- 4- Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 2013 Apr;93(2):525–69.
- 5- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 1998 Jun 29;141(7):1539–50.
- 6- Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 2011 Feb 18;585(4):606–12.
- 7- Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jan;2(1):a002907.
- 8- Dufresne J, Cyr DG. Activation of an SP binding site is crucial for the expression of claudin 1 in rat epididymal principal cells. *Biol Reprod.* 2007 May;76(5):825–32.
- 9- Pope JL, Bhat AA, Sharma A, Ahmad R, Krishnan M, Washington MK, et al. Claudin-1 regulates intestinal epithelial homeostasis through the modulation of Notch-signalling. *Gut.* 2014 Apr;63(4):622–34.
- 10-Gregory M, Dufresne J, Hermo L, Cyr D. Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology.* 2001 Feb;142(2):854–63.
- 11-de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum Reprod.* 1998 Apr;13 Suppl 1:1–8.
- 12-Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 2003 Jul;4(7):544–58.
- 13-Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie.* 2005 Apr;87(3–4):361–8.
- 14-Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M, et al. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):878–91.
- 15-Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002 Mar 18;156(6):1099–111.

- 16-Weber S, Hoffmann K, Jeck N, Saar K, Boeswald M, Kuwertz-Broeking E, et al. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet.* 2000 Jun;8(6):414–22.
- 17-Sugawara T, Iwamoto N, Akashi M, Kojima T, Hisatsune J, Sugai M, et al. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *J Dermatol Sci.* 2013 Apr;70(1):12–8.
- 18-Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 2003 May 12;161(3):653–60.
- 19-Günzel D, Stuver M, Kausalya PJ, Haisch L, Krug SM, Rosenthal R, et al. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci.* 2009 May 15;122(Pt 10):1507–17.
- 20-World Health Organization, editor. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 271 p.