



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO HOSPITAL ÁNGELES PEDREGAL

Perfil transcriptómico en muestras seminales con astenozoospermia y teratozoospermia: circuitos moleculares y su potencial como marcadores diagnósticos.

TESIS

Que para optar por el grado de:
**ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
HUMANA.**

**PRESENTA:
DR. JULIO CÉSAR AVILÉS DURÁN**

**DIRECTOR DE TESIS
Dr. Héctor Salvador Godoy Morales**
Director de Tesis.
Hospital Ángeles Pedregal.

**ASESOR METODOLÓGICO DE TESIS
Dr. Daniel Marrero Rodríguez**
Asesor Metodológico de Tesis.
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Ciudad Universitaria, Ciudad de México.
2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Perfil transcriptómico en muestras seminales con astenozoospermia y teratozoospermia: circuitos moleculares y su potencial como marcadores diagnósticos.

Julio César Avilés Durán¹, Godoy-Morales Héctor-Salvador², Daniel Marrero Rodríguez³

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, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Correspondencia:

Julio César Avilés Durán, 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: javiles1709@hotmail.com

Índice

Resumen	4
Abstract	5
Diseño de estudio, tamaño y duración	6
Antecedentes teóricos	6
Gónadas masculinas	7
Embriología del testículo	7
Espermatogénesis	8
El Espermatozoide	9
Cabeza: acrosoma, membrana y núcleo	10
Flagelo: cuello, pieza media, cola, pieza terminal	11
Proceso de maduración del espermatozoide	11
Capacitación	12
Reacción acrosomal	12
Factores implicados en la infertilidad	13
Evaluación del factor masculino	14
Espermiograma o seminograma	14
Justificación	18
Planteamiento del problema	18
Pregunta de investigación	19
Hipótesis	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Metodología	20
Diseño general de estudio:	20
Definiciones operacionales (operacionalización)	21
Unidad de análisis y observación	22
Procedimientos para la recolección de información y análisis de datos.	22
Resultados	23
Figuras y gráficas	25
Conclusiones	29
Referencias bibliográficas	30

Resumen

Perfil transcriptómico en muestras seminales con astenozoospermia y teratozoospermia: circuitos moleculares y su potencial como marcadores diagnósticos.

Introducción

Clínicamente las alteraciones espermáticas se pueden dividir según su morfología establecidas por los criterios de la OMS del 2010 y solo el 15 al 30% de infertilidad masculina es causada por anomalías genéticas de las cuales prevalecen las anomalías en el cromosoma Y, desconociéndose la gran mayoría de cambios genómicos y transcriptómicos. Por lo cual, el determinar las bases moleculares de la falla reproductiva resulta esencial para el manejo adecuado de la pareja infértil.

Objetivos

Determinar perfiles transcriptómicos de gametos morfológicamente diagnosticados como astenozoospermia y teratozoospermia. Identificación de genes a nivel RNA que pudiesen funcionar como marcadores moleculares de infertilidad para mejorar el manejo y pronóstico reproductivo.

Material y Métodos

Estudio piloto observacional prospectivo de marzo del 2018 a agosto del 2018, donde se valoraron un total de 17 genotecas de normozoospermicos, 4 genotecas de astenozoospermicos y 8 genotecas de teratozoospermicos, se realizó correlación entre microarreglos evaluada mediante Pearson y Spearman y las sondas fueron normalizadas y evaluadas mediante cuantiles sin exclusión. La categorización y agrupamiento de los perfiles transcriptómicos fue mediante el análisis de componentes principales (PCA). Se utilizaron los recursos bio-informáticos: WebGESTALT (http://www.webgestalt.org/webgestalt_2013/) y DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) para determinar el significado biológico y/o participación de estos genes en los distintos procesos celulares. Se recolectaron muestras seminales de varones con teratozoospermia, astenozoospermia y normozoospermia.

Resultados

Se lograron identificar un total de 3,035 genes expresados diferencialmente en los gametos infértiles asociados a anomalías (teratozoospermia y astenozoospermia) en comparación con el grupo control (normozoospermico). De los cuales 542 genes se observaron sobre-expresados mientras que los 2,493 genes restantes disminuyeron su expresión. Estos perfiles transcriptómicos nos permiten discriminar adecuadamente entre astenozoospermicos, teratozoospermicos y normozoospermicos.

Posterior a la identificación de genes alterados, se realizó el análisis de Ontología Génica (GO) para identificar los macro-procesos celulares (procesos biológicos, función molecular y componentes celulares). Se observó que en su gran mayoría participan en metabolismo y regulación biológica así como unión a proteínas, iones y ácidos nucleicos, y se encuentran asociados a membranas celulares y de distintos organelos. Actualmente nos encontramos recolectando muestras de pacientes, varones, infértiles para validar mediante la técnica de la RT-PCR de los marcadores moleculares identificados y propuestos en el presente estudio.

Conclusiones

Se logró determinar el perfil transcriptómico relacionado a gametos infértiles con anomalías morfológicas como astenozoospermia y teratozoospermia, encontrando un total de más de 3,000 genes diferencialmente expresados. Se identificaron los procesos celulares y moleculares que se ven afectados en los hombres infértiles.

La alteración de diversos procesos como: la biosíntesis de lípidos que afecta potencialmente la permeabilidad y rigidez de la membrana celular, el metabolismo celular que potencialmente genera especies reactivas de oxígeno, la alteración en la generación y plegamiento incorrecto de proteínas, afectan el potencial espermático para la fecundación de ovocito. Así también se lograron identificar genes a nivel RNA que pudiesen funcionar como marcadores moleculares para el desarrollo e implementación de métodos diagnósticos de hombre infértiles. La identificación de estos marcadores moleculares nos permitirá desarrollar un método de diagnóstico molecular, rápido, sensible, específico y económico, permitiendo un mejor manejo e identificación del paciente que impactaría en la relación costo beneficio, tanto para el paciente como para la institución.

Abstract

Transcriptome profiling of infertility patients associated to asthenozoospermic and teratozoospermic spermatozoa alterations: molecular circuitry and potential diagnostic markers.

OBJECTIVE: In the present work we sought to determine the molecular signature of the infertile spermatozoa related to known morphological alterations such as asthenozoospermic and teratozoospermic phenotypes by means of available microarray libraries, and validate the *in silico* findings by RT-PCR. The present work, attempts to generate information regarding the transcriptome circuitry of the abnormal spermatozoa as well as identification and proposal of potential molecular marker of infertility to help in the daily clinical decisions by limiting subjective interpretations.

DESIGN: Observational, prospective pilot study from march 2018 to august 2018, where a total of 17 normal-fertile, 4 Asthenozoospermic-infertile and 8 teratozoospermic-fertile experiments, corresponding to equal number of patients, were downloaded and analyzed. Data sets were analyzed by means of CEL files with the Expression Console, Partek Genomics Suite 6.6v software (Partek Incorporated, Saint Louis, MO, USA) and Transcriptome Analysis Console (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Pearson and Spearman correlation was performed and probe sets were summarized by means of Median Polish and normalized by quantiles with no probe sets excluded from analysis. Furthermore, WebGESTALT (http://www.webgestalt.org/webgestalt_2013/) and DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) were used for understanding the biological meaning behind the resulting list of genes, to obtain gene ontology and pathway information for significantly altered genes in interfile spermatozoa's. We are collecting normal-fertile patients and infertile patients.

RESULT(S): A total of 3'035 genes show to be altered. Once the altered genes were identified, biological processes, molecular function and cellular component gene ontology (GO) analyses were carried out, first the up-regulated genes and secondly the down-regulated genes. The GO from the up-regulated genes showed that they participate in biological processes such as metabolism and biological regulation among others, participation in protein-, ion- and nucleic acid binding in molecular function among others, and membrane and nucleus in cellular component among others. The down-regulated genes showed participation in biological processes such as metabolism and biological regulation among others, participation in protein-, ion- and nucleic acid binding in molecular function among others, and membrane and macromolecular complex in cellular component, similarly to the observed in up regulated genes participation.

CONCLUSION(S): We carried out a transcriptomic profile related to infertile gametes with morphological abnormalities such as asthenozoospermia and teratozoospermia, finding a total of more than 3,000 genes differentially expressed. We identified the cellular and molecular processes that are affected in infertile men. The alteration of the various processes such as: the biosynthesis of lipids that potentially affects the permeability and rigidity of the cell membrane, the cellular metabolism that potentially generates reactive oxygen species, the alteration in the generation and the incorrect folding of proteins, affects the potential sperm for oocyte fertilization. In this way, it was also possible to identify genes at the RNA level that could act as molecular markers for the development and implementation of infertile man-made diagnostic methods.

The identification of these molecular markers allows us to develop a molecular diagnosis method, fast, sensitive, specific and economical, which allows a better management and identification of the patient that impacts on the cost-benefit relation, both for the patient and for the institution.

Diseño de estudio, tamaño y duración

Estudio piloto observacional prospectivo, realizado entre Marzo del 2018 y Agosto del 2018. Se valoraron un total de 28 genotecas con correlación entre microarreglos. Mediante la utilización de los recursos bio-informáticos para determinar el significado biológico y/o participación de estos genes en los distintos procesos celulares.

Antecedentes teóricos

La infertilidad se encuentra definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por el comité internacional para el Monitoreo de las tecnologías de reproducción asistida como la falla para lograr un embarazo clínico en un año o mas de tener relaciones sexuales sin protección de manera regular (Gurunath, Pandian, Anderson, & Bhattacharya, 2011). La infertilidad se considera como una enfermedad que resulta ser una problemática de salud pública ya que afecta aproximadamente en un 10 a 15% de parejas a nivel mundial. En mas del 50% de estos casos el problema base es puramente por factor masculino (Tahmasbpour, Balasubramanian, & Agarwal, 2014).

La infertilidad masculina se asocia a diversos factores, entre ellos, defectos anatómicos como el varicocele, quistes de epidídimo, obstrucción en los diversos niveles de los conductos espermáticos, fallas en eyaculación, alteraciones endocrinas e inmunológicas así como el estilo de vida y cuestiones ambientales afectan al desarrollo del gameto y del embrión (Tahmasbpour, Balasubramanian, & Agarwal, 2014).

Clínicamente las alteraciones espermáticas se pueden dividir según su morfología establecidas por los criterios de la OMS del 2010 en azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado), oligozoospermia (concentración menor de 15 millones/mL), astenozoospermia (menos del 32% de motilidad progresiva A+B) y teratozoospermia (menos del 4% de formas normales). Estas anomalías se presume son causadas por múltiples factores, incluyendo especies reactivas de oxígeno (ROS), causas

genéticas y alteraciones epigenéticas así como el desequilibrio hormonal y factores ambientales (Bracke, Peeters, Punjabi, Hoogewijs, & Dewilde, 2018). Solo el 15 al 30% de infertilidad masculina es causada por anomalías genéticas de las cuales prevalecen las anomalías en el cromosoma Y, desconociéndose la gran mayoría de cambios genómicos y transcriptómicos (Krausz, Forti, & McElreavey, 2003). Por lo cual, el determinar las bases moleculares de la falla reproductiva resulta esencial para el manejo adecuado de la pareja infértil (O'Flynn-O'Brien, Varghese, & Agarwal, 2010).

La evaluación de la morfología espermática bajo microscopía óptica es el método mayormente utilizado y aceptado para discernir entre un hombre fértil de un infértil. Sin embargo numerosas publicaciones han señalado la debilidad metodológica con múltiples variaciones entre interpretador de dicho método. Este tipo de evaluación demuestra que las modificaciones morfológicas durante la espermatogénesis no son homogéneas, generando espermatozoides con diversas morfologías.

Gónadas masculinas

Embriología del testículo

En un embrión genéticamente masculino, las células germinales primordiales tienen un complemento de cromosomas sexuales XY, esto debido al gen SRY localizado en el cromosoma Y, el cual es conocido como el mayor regulador del desarrollo gonadal, la ausencia de este resulta en desarrollo de ovarios.

El primer paso de la diferenciación sexual se lleva a cabo en las primeras 7 semanas de desarrollo embrionario iniciando con el establecimiento del sexo genético. Los cordones sexuales primitivos seguirán proliferando y se introducirán profundamente en la médula gonadal para formar los cordones testiculares o medulares. Hacia el hilio de la glándula, los cordones se dispersan en una red de filamentos celulares diminutos que posteriormente darán origen a los túbulos de la red de Haller o rete testis. Después, la túnica albugínea que es una capa compacta de tejido fibroso, separará a los cordones del testículo de la superficie epitelial (15).

En el cuarto mes los cordones testiculares están compuestos por células germinales primordiales y células de sostén de Sertoli, que son derivadas del epitelio superficial de la glándula. Estas resultan esenciales para la histogénesis y funciones posteriores ya que en el adulto crean un nicho para la diferenciación de la espermatogonia y le brindan soporte estructural como se mencionó previamente así como nutrientes y factores de crecimiento (15). La hormona folículo estimulante liberada por la hipófisis es de suma importancia para el desarrollo de las células de Sertoli, cualquier alteración a este nivel, reduce la fertilidad.

Las células intersticiales de Leydig se desarrollan a partir del mesénquima original de la cresta gonadal y se encuentran entre los cordones testiculares, estas comienzan su proliferación y diferenciación para la semana 7 bajo la influencia de las células de Sertoli. En la octava semana de desarrollo, las células de Leydig empiezan a producir testosterona entre otros andrógenos y el testículo puede influir entonces en la diferenciación sexual de los conductos genitales y de los genitales externos (15). Las células de Leydig son estimuladas por la hormona luteinizante liberada en la hipófisis. Los cordones testiculares cuando se canalizan dan origen a los túbulos seminíferos. Los conductos eferentes son las porciones remanentes de los túbulos excretores del sistema mesonéfrico y actúan como vínculo entre la rete testis y el conducto mesonéfrico o de Wolff, que recibe el nombre de conducto deferente. Finalmente los testículos migran al escroto en 2 fases, la inicial es la migración transabdominal y la segunda es el paso a través del canal inguinal.

Espermatogénesis

La espermatogénesis es un evento complejo y temporal en el cual una célula haploide indiferenciada (espermatogonia) lentamente evoluciona a una célula haploide especializada llamada espermatozoide. El objetivo de la espermatogénesis es producir un gameto masculino único capaz de fertilizar un ovocito.

La migración de células germinales al tubérculo genital en el embrión general un aproximado de 300,000 espermatogonios en cada gónada en la cual hacia

la etapa de la pubertad experimentan una serie de divisiones mitóticas dejando unos 600 millones en cada gónada. Durante la vida adulta se mantiene la producción de 100 a 200 millones de espermatozoides al día.

Durante la espermatogénesis, los espermatogonios diploides (46 cromosomas) se convierten en espermaticitos primarios antes de entrar a la meiosis. En la primera división meiótica, se obtienen 2 espermaticitos secundarios (haploides 23 cromosomas), cada uno originando 2 espermátides en la segunda división meiótica para posteriormente madurar y convertirse en espermatozoide maduro (16).

Durante el proceso de maduración de las espermátides, el núcleo se desplaza a una posición excéntrica en la cabeza de la espermátide y se cubre por un acrosoma (16). La parte central de la cola del espermatozoide consta de 9 fibras externas alrededor de 2 fibras internas la cual es rodeada en la sección media por mitocondrias.

El proceso de espermatogénesis dura 70 días aproximadamente para completarse, y este es dirigido por genes localizados en el cromosoma Y. El transporte de los espermatozoides desde el testículo al conducto eyaculador requiere de 12 a 21 días para tener la última fase de maduración, la cual se lleva a cabo en el tracto genital femenino.

El Espermatozoide

Es una célula haploide que constituye el gameto masculino. Estos se forman en el epitelio germinal en el interior de los testículos. La formación de los espermatozoides se da por un proceso llamado espermatogénesis. Este proceso de división meiótica es controlado por el eje hipófisis-hipotálamo-gónada. A partir de cada espermatogonia se producen cuatro espermaticitos haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos y a la vez están en comunicación con la célula nutricia o de Sertoli; estas últimas, a partir de moléculas señalizadoras, inducen el proceso denominado espermiogénesis o metamorfosis que convierte las espermátides en espermatozoides (16).

Los espermatozoides se componen morfológicamente de una cabeza, parte intermedia y flagelo, encontrando otras estructuras en cada una de estas partes.

Cabeza: acrosoma, membrana y núcleo

La cabeza contiene dos partes principales:

- El **acrosoma**, que cubre los dos tercios anteriores de la cabeza.
- El **núcleo**, que contiene la carga genética del espermatozoide (23 cromosomas, en el pronúcleo, que unidos a los 23 del óvulo dan lugar a la célula madre, al sumarse el total de 46 cromosomas, agrupados en pares).

En los seres humanos la medida de la cabeza del espermatozoide es de 5 μm (micrómetros) de longitud. Tanto el pronúcleo como el acrosoma están envueltos en medio de una pequeña cantidad de citoplasma y revestidos por una membrana plasmática que une la cabeza al cuerpo del espermatozoide (17).

El **acrosoma** es una capa formada por enzimas como la hialuronidasa y la acrosina, que favorecerán la penetración, debilitando mediante la degradación de las paredes del óvulo, concretamente, la zona pelúcida que rodea al ovocito. Ello facilita la fusión de la parte de la membrana del espermatozoide que contacta con la membrana del ovocito, de tal forma que se abre un canal al interior del óvulo, dándose la señalización intracelular.

El **núcleo**, después de que el acrosoma se abre paso por las barreras del óvulo, es la única parte que entra a su citoplasma, dejando atrás la membrana ya vacía, para luego fusionarse con el núcleo del óvulo, completarse como célula diploide y empezar la división celular (mitosis). Por ende, como las mitocondrias y todo lo demás del gameto masculino no se unen al cigoto, todas las mitocondrias de la nueva célula provienen de la parte materna.

Flagelo: cuello, pieza media, cola, pieza terminal

El cuello contiene residuos citoplasmáticos de la espermatida. Este contiene un centriolo, el distal, que origina la pieza media, y el proximal desaparece luego de haber dado origen al flagelo. Contiene una placa basal de material denso que es donde se anclan 9 columnas proteicas, que son centriolos modificados, continuándose por toda la cola.

La pieza media (de unos 4 o 5 μm de longitud) posee una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal, que proveen de energía al espermatozoide, produciendo ATP.

La cola (de 35 μm) le proporciona movilidad, y ésta puede ser de tipo A, B, C o D, según se observe en el seminograma. Tipo A correspondería a los espermatozoides con movimiento a una velocidad mayor de 25 micras/s, frente a las 5-24 micras/s del tipo B, una velocidad inferior a 5 micras/s para el tipo C y un movimiento nulo para el tipo D.

Proceso de maduración del espermatozoide

Existen cuatro fases características en esta transformación: la fase de Golgi, la de capuchón, la acrosomal y la de maduración.

En la fase de Golgi, esta organela se acerca al núcleo y desprende vesículas que se le superponen y poco a poco se unen para convertirse en la vesícula acrosomal que se localiza en la parte apical del núcleo.

En la fase de capuchón, la vesícula acrosomal se aplana formando una verdadera capucha sobre el núcleo. El núcleo se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas, de tal forma que no puede haber ni replicación ni transcripción. La inactividad transcripcional del núcleo hace que el espermatozoide sea dependiente de modificaciones postranscripcionales como las fosforilaciones de proteínas necesarias para adaptar la función de acuerdo a sus necesidades (17).

En la fase acrosomal la espermatide gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal; se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este

último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media. En esta fase el espermatozoide adquiere su morfología definitiva.

Fase de maduración, donde se observan las características finales de los espermatozoides: forma de la cabeza característica de cada especie (oval y plana), cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma; y la cola compuesta por las piezas media, principal y terminal; en la pieza media se encuentran las mitocondrias en forma de hélice. En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal de la cola originando la llamada gota citoplasmática. El proceso de maduración termina con la espermiación, o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero.

Mediante movimientos peristálticos los espermias son transportados de la rete-testis a los ductos eferentes y de allí al epidídimo en cuya cola se almacenan. Durante la eyaculación los espermatozoides junto con el plasma seminal pasan por la uretra y a través de movimientos peristálticos se liberan en el tracto genital femenino.

Capacitación

La capacitación, se caracteriza por la salida de colesterol de la membrana y el ingreso de Ca^{++} y HCO_3^- al citosol. El fluido oviductal es rico en albúminas y HDL, capaces de retirar el colesterol de la membrana del esperma, lo que la hace más fluida al producir la ruptura de la unión de las caveolinas con las proteínas de fusión; estas últimas al quedar libres forman complejos de señalización de fusión de membranas (reacción acrosomal); el aumento de la fluidez también permite que proteínas integrales puedan interactuar con las proteínas ancladas a membrana (18).

Reacción acrosomal

Inicialmente la zona pelúcida expone glicoproteínas de reconocimiento que interactúan con la membrana del espermatozoide de varias formas: proteína–proteína, donde se reconoce el receptor de 95KDa del esperma (receptor tirosina quinasa, TK); y proteína–carbohidrato para el reconocimiento de la

Galtasa como receptor acoplado a proteína G, que se une a la N acetil glucosamina de la ZP3. Una vez que acoplan estas moléculas se activa la fosfolipasa C β 1 (PLC β 1) y la adenilil ciclase, con el subsecuente aumento los niveles de AMP cíclico que activarían la proteína quinasa A (PKA), y permiten la apertura de un canal de Ca⁺⁺, voltaje dependiente, en la membrana acrosomal externa.

Este pequeño incremento de Ca⁺⁺ intracitoplasmático activa la fosfolipasa C γ que se une al receptor de tirosina quinasa para inducir una ruta de señalización. Cuando se da la interacción proteína-carbohidratos, el receptor unido a proteína G, activa la fosfolipasa C β 1, lo que induce la hidrólisis del fosfatidil inositol di fosfato (PIP2) con generación de diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El DAG activa la proteína quinasa C, lo que lleva a la apertura de un canal dependiente voltaje en la membrana plasmática y permite el ingreso de altas cantidades de Ca⁺⁺. El IP3 y la PKA abren un canal en la membrana acrosomal externa, lo que lleva a la depleción del Ca⁺⁺ en el espacio intraacrosomal, y esto activa el canal de Ca⁺⁺ “capacitante” en la membrana citoplasmática (19). El incremento de Ca⁺⁺ regula su propia salida tanto en la membrana plasmática como en la zona acrosomal, mediante la activación de canales de Ca⁺⁺, dependiente de ATP, y con la activación de los intercambiadores Na⁺- Ca⁺⁺. La PKA fosforila los residuos de serina de las proteínas (PSP); éstas, a su vez, fosforila los residuos de tirosina de las proteínas citosólicas que junto con el aumento del pH y de Ca⁺⁺ citosólico, permiten la fusión de membranas (citoplasmática y acrosomal externa), y de esta manera se produce la exocitosis del contenido enzimático del acrosoma. El espermatozoide atraviesa la zona pelúcida (ZP) y alcanza el espacio perivitelino, los mecanismos involucrados en este paso aún se desconocen (19).

Factores implicados en la infertilidad

Como se menciono previamente, se le atribuye al factor masculino el 40 a 50% de los casos de infertilidad (Eisenberg, Shungfei, Behr, & Cullen, 2014). De acuerdo con su etiología, la infertilidad masculina es clasificada para su estudio en:

- Pre-testiculares
- Testiculares
- Post testiculares

Y para este propósito se cuentan con múltiples estudios para la evaluación del espermatozoide.

Evaluación del factor masculino

El factor masculino se evalúa por diversos procesos :

- Seminograma
- Fragmentación
- Pruebas de membrana
- Pruebas especiales

Espermiograma o seminograma

Examen macroscópico:

Los parámetros analizados en este examen y sus valores de referencia según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Trevor G Cooper, 2010) son:

- **Licuefacción:** Una muestra normal se licúa dentro de los 60 minutos de la eyaculación a temperatura ambiente, aunque esto suele ocurrir dentro de los primeros 15 minutos.
- **Aspecto:** Una muestra normal tiene una apariencia homogénea gris-opalescente.
- **Volumen:** Una muestra normal tiene un volumen $\geq 1,5$ ml.
- **Viscosidad:** Una viscosidad elevada puede dificultar la movilidad de los espermatozoides.
- **pH:** El pH de una muestra seminal debe de ser ≥ 7.2 . Alteraciones en el pH nos indican una alteración a nivel de próstata o vesículas seminales.

Examen microscópico:

Los parámetros analizados en este examen y sus valores de referencia según la OMS son:

- **Vitalidad espermática:** El test de vitalidad espermática nos indica la proporción de espermatozoides vivos que hay en el eyaculado. Esta debe de ser $\geq 58\%$
- **Leucocitos:** Una muestra normal no debería contener más de 1 millón de leucocitos/ml.
- **Concentración espermática:** Es el número de espermatozoides por ml de muestra seminal y debe de ser ≥ 15 M/ml
- **Movilidad espermática:** Se clasifica en tres categorías:
 - Espermatozoides de movilidad progresiva
 - Espermatozoides de movilidad no progresiva
 - Espermatozoides inmóviles

VALORES DE REFERENCIA SEGÚN LA OMS (5ª edición, 2010)	
Volumen	$\geq 1,5$ ml
pH	≥ 7.2
Concentración espermática	≥ 15 M/ml
Número total espermatozoides	≥ 39 M/eyaculado
Motilidad	$\geq 32\%$ con progresión
Vitalidad	$\geq 58\%$
Leucocitos	< 1 M/ml

NOMENCLATURA DE ALGUNAS VARIABLES DEL SEMEN SEGÚN LA OMS (5ª edición, 2010)	
Normozoospermia	Eyaculado normal según los valores de referencia
Azoospermia:	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado
Oligozoospermia:	Concentración de espermatozoides menor al valor de referencia
Astenozoospermia:	Motilidad inferior al valor de referencia
Necrozoospermia:	Disminución de las formas vivas según el valor de referencia
Aspermia:	Ausencia del eyaculado

Perfil transcriptómico en el esperma

Aproximadamente 2 tercios de los casos de defectos no obstructivos de la espermatogénesis en una muestra de semen morfológicamente normal, permanecen sin explicación.

La selección del espermatozoide basado en técnicas de morfología o sus propiedades cinéticas (gradientes de centrifugación y swim-up) han demostrado ser ineficientes para la elección del esperma ideal. Aun así teniendo información sobre la oxidación del DNA espermático, no se tiene un esperma molecularmente perfecto.

Ya existen múltiples investigaciones sobre el estudio del mRNA espermático en las cuales está descrito que sobreviven a diferentes estadios de la espermatogénesis previamente al silenciamiento nuclear, incluso en el empaquetamiento del ADN (12). Estos RNA mensajeros se asocian a una singamia exitosa y un buen desarrollo embrionario (13) y ciertos mRNA se han encontrado deficientes en los ovocitos. Por ende se describe que estos RNA mensajeros son necesarios para el desarrollo del cigoto previo a la activación del genoma embrionario.

Otras funciones de estas moléculas incluyen reemplazo de proteínas degradadas y regulación epigenética. Además se ha descrito actividad

transcripcional en la mitocondria. El mRNA es capaz de salir del núcleo evitando ser eliminado para así permanecer funcional en otros sitios de la célula (13).

Como resultado de los diversos estudios, se han logrado detectar miles de mRNA con un amplio rango de ontologías. Esto puede ser utilizado para explicar causas de infertilidad idiopática en donde la fertilización y desarrollo embrionario correcto no se logra, representando una herramienta diagnóstica potencial.

Microarreglos

Un microarreglo de mRNA puede ser descrito como la hibridación molecular en una matriz de vidrio, silicona o nylon de sondas de oligonucleótidos que se anclan de una manera precisa a una localización microscópica específica, fijando fragmentos de mRNA complementario de muestras complejas marcadas mediante inmunofluorescencia. Después de realizar el escaneo del microarreglo con herramientas de análisis, el software interpreta la señal correspondiente así como su intensidad y localización, relacionándolo con la expresión del mRNA del individuo.

De esta manera, los microarreglos, nos proveen con una visión general de los patrones de expresión en respuesta a alteraciones fisiológicas o a reguladores de manipulación transcripcional. Esto nos puede auxiliar a determinar el comportamiento biológico de tejidos normales y anormales.

Existen análisis más complejos como el análisis de componentes principales, el cluster jerárquico y la construcción de herramientas predictivas para determinar la eficacia de esta predicción mediante una muestra de validación. (14). Dichos análisis se llevan a cabo en el presente estudio.

Justificación

Se estima en la actualidad una prevalencia de infertilidad en México alrededor del 32%, del cual casi la mitad es representado por algún factor masculino; Este resulta ser una de las mayores problemáticas debido a que no se cuentan con muchas herramientas para su valoración, la gran mayoría de centros se basan en valoración macroscópica (seminograma) y fragmentación del ADN espermático, dejando a un lado a los poco conocidos marcadores biomoleculares que se llevan a cabo durante el proceso de espermatogénesis. Dichos procesos resultan importantes inclusive para la fertilización adecuada de un ovocito.

Este proyecto se justifica al tratar de evaluar al espermatozoide con forma transcriptómica y todas sus vías moleculares de señalización durante el proceso de espermatogénesis con la repercusión en la fertilización del ovocito. Este se realizó en el centro medico nacional siglo XXI en conjunto con ART reproducción en el hospital Ángeles Pedregal.

Planteamiento del problema

Generar información de la biología celular y molecular de los pacientes infértiles diagnosticados con alteraciones morfológicas espermáticas como astenozoospermia y teratozoospermia.

Determinar perfiles transcriptómicos de gametos morfológicamente diagnosticados como astenozoospermia y teratozoospermia.

Identificación de genes a nivel RNA que pudiesen funcionar como marcadores moleculares de infertilidad para mejorar el manejo y pronostico reproductivo.

Disminuir la variabilidad subjetiva que se presenta con la espermatobioscopía directa.

Demostrar que la implementación de una prueba de diagnóstico molecular en hombres con infertilidad asociada a astenozoospermia o teratozoospermia, mejora la relación costo beneficio tanto institucional como para la pareja infértil.

Pregunta de investigación

¿Se puede discernir molecularmente entre un gameto con potencial de fertilización y aquel que no demuestra este potencial? y ¿cuales son los genes que excluyen el uno del otro? (Gatimel, Moreau, Parinaud, & Léandri, 2017).

Hipótesis

La distinción de los genes regulados a la baja y a la alza así como sus distintas fases moleculares y los caminos metabólicos, nos determinan el potencial de fertilización de un ovocito.

Objetivo general

Generar información de la biología celular y molecular de los pacientes infértiles diagnosticados con alteraciones morfológicas espermáticas como astenozoospermia y teratozoospermia.

Objetivos específicos

Primario:

Determinar perfiles transcriptómicos de gametos morfológicamente diagnosticados como astenozoospermia y teratozoospermia.

Secundarios:

Identificación de genes a nivel RNA que pudiesen funcionar como marcadores moleculares de infertilidad para mejorar el manejo y pronóstico reproductivo.

Disminuir la variabilidad subjetiva que se presenta con la espermatobioscopía directa y demostrar que la implementación de una prueba de diagnóstico molecular en hombres con infertilidad asociada a astenozoospermia o teratozoospermia, mejora la relación costo beneficio tanto institucional como para la pareja infértil.

Metodología

Estudio piloto observacional prospectivo. Se realizaron análisis de perfiles transcriptómicos, analizando y correlacionando transcritos y una correlación de microarreglos. Se determinaron perfiles biológicos de los genes.

Diseño general de estudio:

Análisis transcriptómico por microarreglos del espermatozoide normal y anormal.

Un total de 17 genotecas de normozoospermicos, 4 genotecas de astenozoospermicos y 8 genotecas de teratozoospermicos, correspondientes al mismo numero de pacientes, fueron descargadas y analizadas. Los parámetros de control de calidad como el indice de Pearson y Spearman, marcaje e hibridación fueron analizados previo a la inclusión al estudio. La información utilizada para estos análisis fueron descargados del Instituto Europeo de Bio Informática (EMBL-EBI) y de GEO del NCBI. Esta información es de GSE6872 y GSE34514 que corresponde a la plataforma Affymetrix Human Gene Chip U133 Plus 2.0. Estos microarreglos analizan un total de 47,000 transcritos entre codificantes (mRNA) y no codificantes (miRNA). Los archivos .CEL fueron analizados con los softwares Partek Genomics Suite. La correlación entre microarreglos fue evaluada mediante Pearson y Spearman y las sondas fueron normalizadas y evaluadas mediante cuantiles sin excluir ninguna sonda y Median Polish. El fondo se eliminó utilizando el RMA (Robust Multi-chip Average) y los datos fueron transformados a log₂-. La categorización y agrupamiento de los perfiles transcriptómicos fue mediante el análisis de componentes principales (PCA). Los genes diferencialmente expresados se determinaron mediante una prueba de ANOVA. Se consideraron como alterados o diferencialmente expresados aquellos que presentaban +2 o -2 veces de cambio en el grupo problema en comparación con el grupo normal con una $p \leq 0.01$ y $FDR > 0.01$.

Una vez que se obtuvieron las listas de los genes diferencialmente expresados, se utilizaron los recursos bio-informáticos: WebGESTALT (http://www.webgestalt.org/webgestalt_2013/) y DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) para determinar el significado biológico y/o participación de estos genes en los distintos procesos celulares.

Grupo de estudio

Genotecas de varones normozoospermicos, astenozoospermicos y teratozoospermicos.

Definiciones operacionales (operacionalización)

Nombre de la variable: **Transcriptoma espermático**

Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Unidades de medición:
Variable dependiente, Cualitativa, principal	genes que presentan regulación a la alza o genes que presentan regulación a la baja, en perfiles con teratozoospermia, astenozoospermia y normozoospermia	Expresión de genes con regulación a la alza o a la baja	Presencia de genes en espermatozoide.	Porcentaje

Nombre de la variable: **Espermatozoide**

Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Valores de referencia	Unidades de medición:
Variable independiente, Cuantitativa, principal	Célula haploide que constituye el gameto masculino. Su función es la formación de un cigoto totipotente al fusionarse su núcleo con el del gameto femenino, fenómeno que dará lugar, posteriormente, al embrión y al feto.	Determinación de células germinales en el eyaculado, por semiograma.	Observación de células germinales en el eyaculado.	Parámetros de la OMS 2010	millones

Unidad de análisis y observación

Criterios de inclusión

- genotecas de normozoospermicos
- genotecas de astenozoospermicos
- genotecas de teratozoospermicos

Criterios de exclusión

- Pacientes masculinos con diagnóstico de azoospermia.
- Pacientes que ya tengan diagnóstico previo de cariotipo alterado.

Procedimientos para la recolección de información y análisis de datos.

- La información utilizada para los análisis fueron descargados del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) y de GEO del NCBI. Esta información es de GSE6872 y GSE34514 que corresponde a la plataforma Affymetrix Human Gene Chip U133 Plus 2.0.
- Los archivos .CEL fueron analizados con los softwares Partek Genomics Suite.
- Se utilizaron los recursos bio-informáticos: WebGESTALT (http://www.webgestalt.org/webgestalt_2013/) y DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) para determinar el significado biológico y/o participación de estos genes en los distintos procesos celulares.

CONSIDERACIONES ETICAS

Se realizó el ensayo clínico conforme a los principios éticos para la investigación médica en humanos establecidos en la Declaración de Helsinki, aclarando que este proyecto de investigación, fue revisado por el consejo de ética de ART reproducción, quienes se encargaron de la aprobación del estudio, previo a la realización del mismo.

Resultados

Se lograron identificar un total de 3,035 genes expresados diferencialmente en los gametos infértiles asociados a anomalías (teratozoospermia y astenozoospermia) en comparación con el grupo control (normozoospermico). De los cuales 542 genes se observaron sobre-expresados mientras que los 2,493 genes restantes disminuyeron su expresión (Figura 1). Estos perfiles transcriptómicos nos permiten discriminar adecuadamente entre astenozoospermicos, teratozoospermicos y normozoospermicos (Figura 2).

Posterior a la identificación de genes alterados, se realizó el análisis de Ontología Génica (GO) para identificar los macro-procesos celulares (procesos biológicos, función molecular y componentes celulares) en los cuales se clasifican o participan estos genes. Se observó que en su gran mayoría participan en metabolismo y regulación biológica así como unión a proteínas, iones y ácidos nucleicos, y se encuentran asociados a membranas celulares y de distintos organelos.

Seguido se realizó el análisis de rutas celulares y se observó que tienen participación importante en el metabolismo celular con genes como alcohol deshidrogenasa 4 (ADH4) (ADH1B), distintos citocromos de la familia P450 (CYP2U1, CYP19A1), procesos de fosforilación oxidativa con genes NADH deshidrogenasa (NDUFC2, NDUFV2) (Figura 3), citocromo oxidasa 6 C (COX6C), que en conjunto modifican la generación de especies reactivas de oxígeno, esto es de relevancia ya que la elevación de estas (ROS) causan depleción de ATP, una fosforilación insuficiente del axonema, peroxidación de lípidos con la consiguiente pérdida de motilidad y viabilidad espermática.

También se modifica la transducción de señal mediadas por factores de crecimiento con genes como factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF9) y (FGF20). Que están implicados en el desarrollo embrionario, crecimiento y morfología celular.

Así como también se encontró alterado el proceso de proteólisis mediada por ubiquitina con los genes de conjugación de ubiquitina UBE2D3 y UBE2I. Espermatozoides anómalos se ubiquitinizan en epítopes de superficie durante el paso en el epidídimo, tales mecanismos son capaces de reconocer daño estructural al DNA y/o estructuras accesorias.

Se identificaron genes asociados a la movilización de calcio intra y extra celular como CACNA1E y CAMK2D, de vital relevancia durante el proceso de capacitación espermática.

Genes que participan en el metabolismo de lípidos como biosíntesis de fosfatidilinositol (PIGB) y PIGM, estos eventos pudiesen alterar la membrana celular.

También existieron variaciones en los procesos de traducción y plegamiento de proteínas con genes relacionados a proteínas ribosomales como RPLP2, RPS29, proteínas de choque térmico (HSP90B1, HSPH1) y re-arreglos del citoesqueleto.

Figuras y gráficas

Teratozoospermic and Asthenozoospermic-Infertile Vs Normozoospermic-Fertile

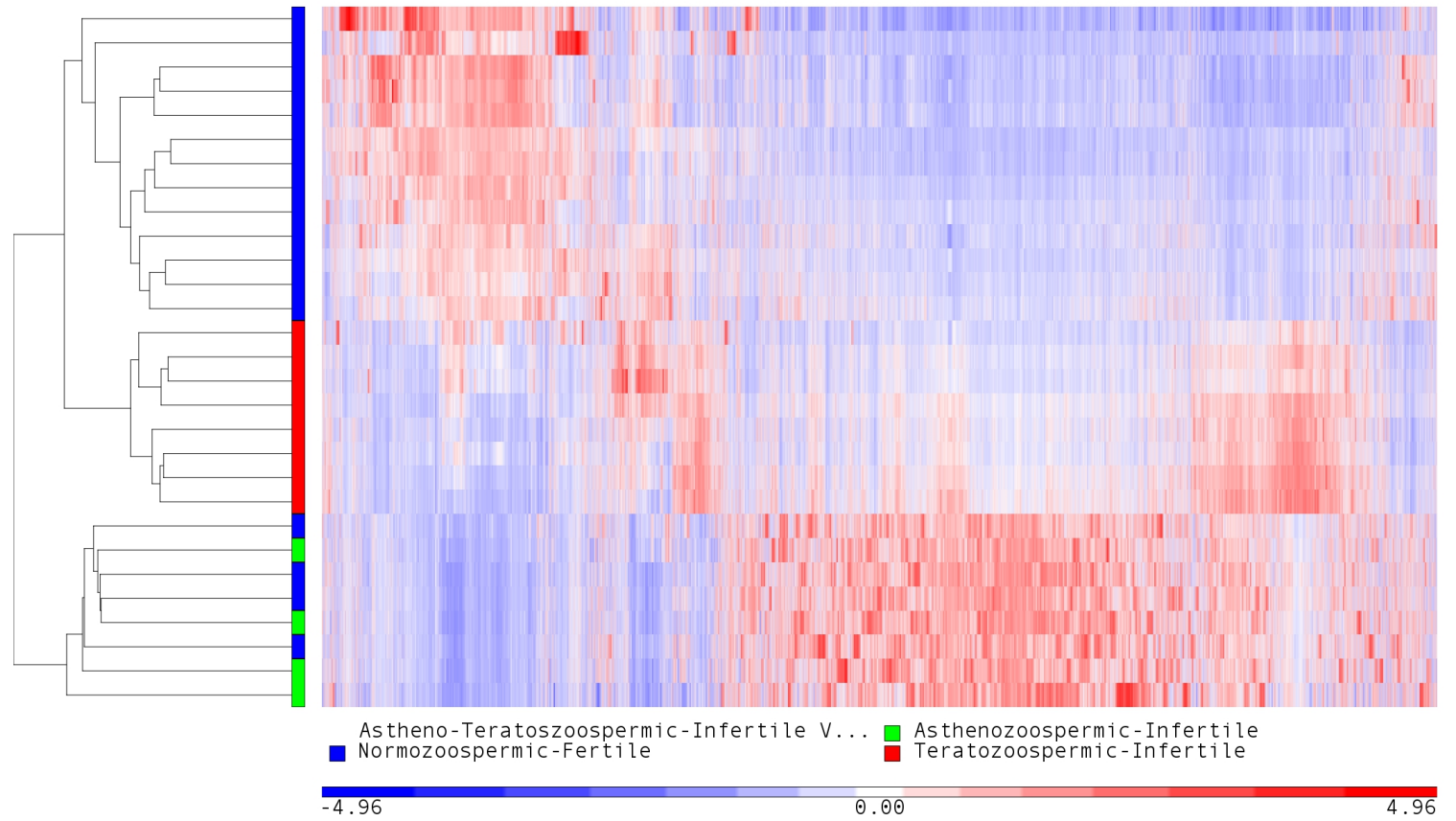
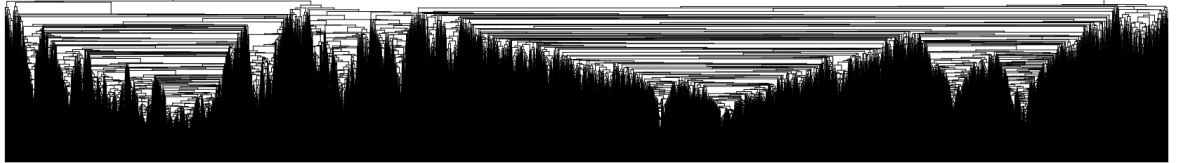


Figura 1.- Análisis transcriptómico, indicando los genes diferencialmente expresados entre condiciones. Azul: Fértil - normozoospermico. Verde: Infertil - astenozoospermico. Rojo: Infertil - teratozoospermico. Existen transcritos que caracterizan cada uno de los grupos

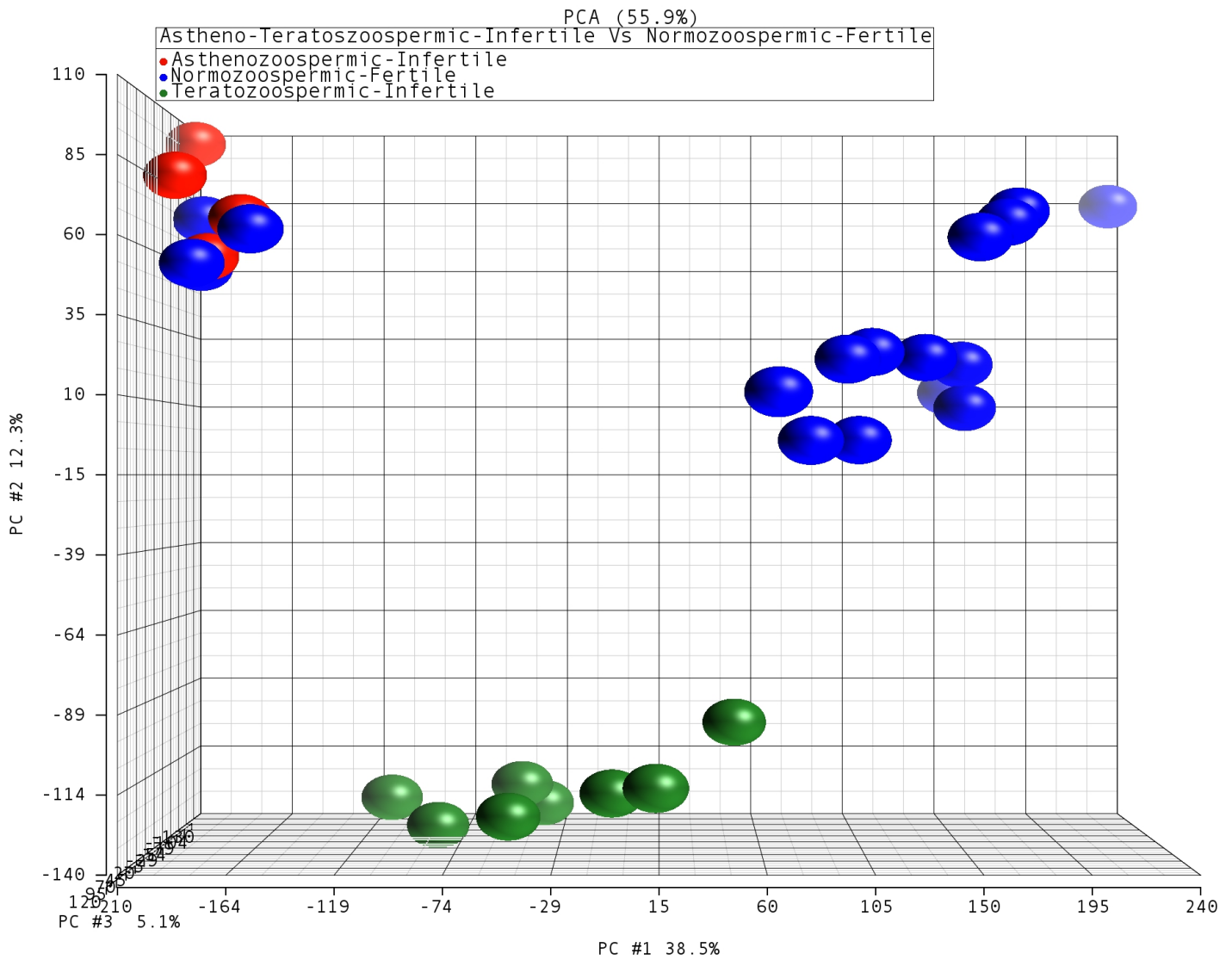


Figura 2: Análisis de componentes principales que muestra discriminación en base al transcriptoma en los 3 distintos grupos. Rojo: astenozoospermico. Azul: Normozoospermico. Verde: teratozoospermico.

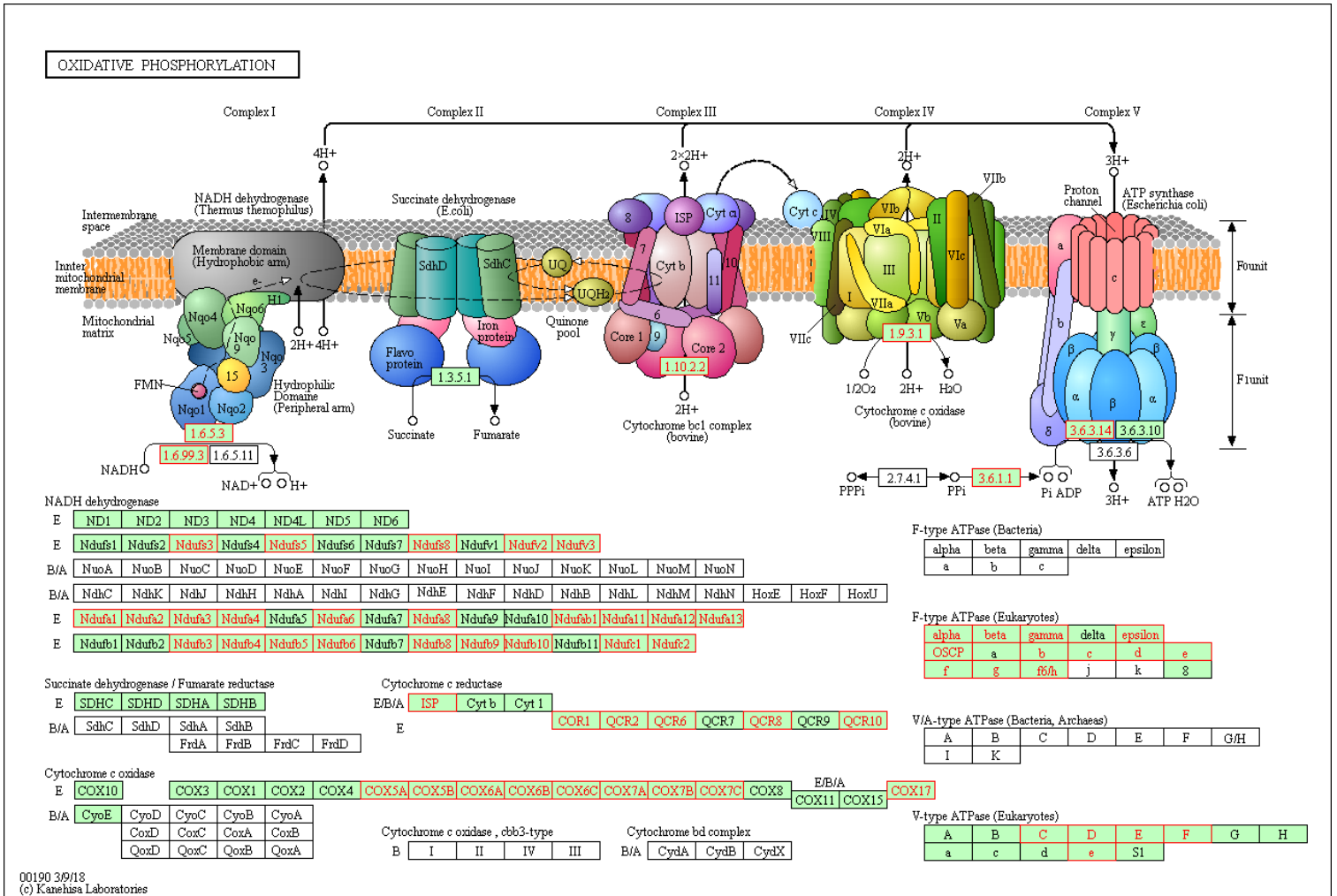
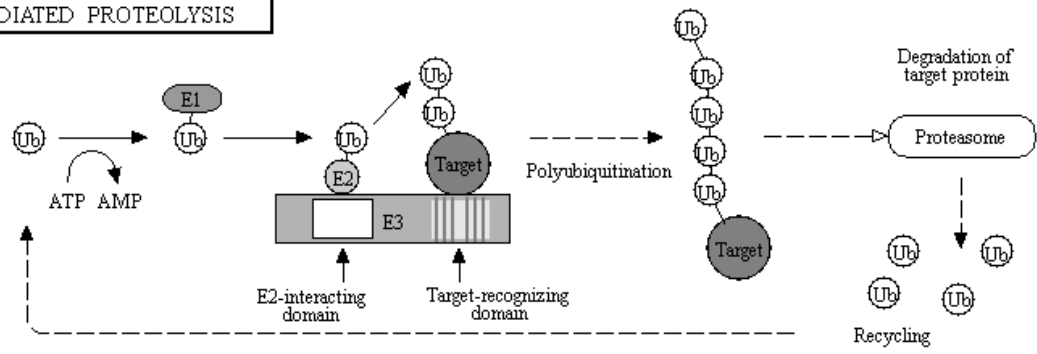


Figura 3.- Representación esquemática de fosforilación oxidativa. Resaltado con rojo los genes alterados, identificados en el presente estudio.

UBIQUITIN MEDIATED PROTEOLYSIS



E1
(Ubiquitin-activating enzyme)

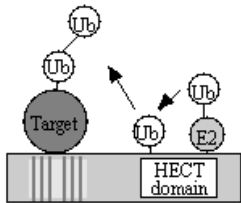
UBE1	UBLE1A	UBLE1B	UBE1C
------	--------	--------	-------

E2
(Ubiquitin-conjugating enzyme)

UBE2A	UBE2B	UBE2C	UBE2D	UBE2E	UBE2F	UBE2G1	UBE2G2	UBE2H
UBE2I	UBE2J1	UBE2J2	UBE2L3	UBE2L6	UBE2M	UBE2N	UBE2O	
UBE2Q	UBE2R	UBE2S	UBE2U	UBE2W	UBE2Z	HIP2	APC11CN	

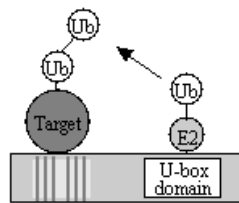
E3
(Ubiquitin ligase)

HECT type E3



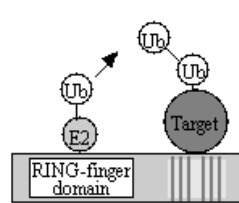
E6AP	UBE3B	UBE3C	Smurf	Itch
WWP1	WWP2	TRIP12	NEDD4	ARF-BP1
EDD1	HERC1	HERC2	HERC3	HERC4

U-box type E3



UBE4A	UBE4B	CHIP
CYC4	PRP19	UIP5

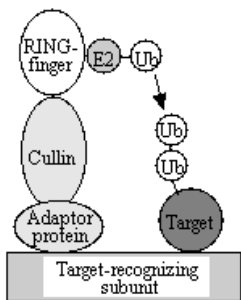
single RING-finger type E3



Mdm2	CBL	Parkin	SHAH-1	PML	TRAF6	MEKK1
COP1	PIRH2	cIAPs	PIAS	SYVN	NHLRC1	AIRE
MGRN1	BRCA1	FANCL	MID1	Trim32	Trim37	

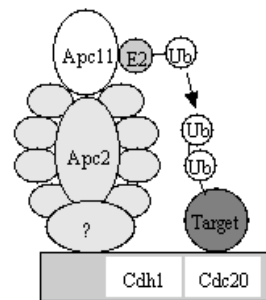
multi subunit RING-finger type E3

Cullin-Rbx E3



	RING finger	Cullin	Adaptor protein	Target recognizing subunit
SCF complex	RBX1	Cul1	Skp1	F-box
ECV complex	RBX1	Cul2	EloB EloC	VHLbox
Cul3 complex	RBX1	Cul3	BTB	
Cul4 complex	RBX1	Cul4	DDB1	DCAF
ECS complex	RBX2	Cul5	EloB EloC	SOC3box
Cul7 complex	RBX1	Cul7	Skp1	Fbxw8

APC/C



	RING finger	Cullin	Adaptor protein	Target recognizing subunit	Other subunits
APC/C	Apc11	Apc2	?	Cdc20	Apc1 Apc3
				Cdh1	Apc4 Apc5
					Apc6 Apc7
					Apc8 Apc9
					Apc10 Apc12
					Apc13

Figura 4.- Representación esquemática del proceso de proteólisis mediado por ubiquitinas. Resaltado con rojo los genes alterados, identificados en el presente estudio.

Conclusiones

Se logró determinar el perfil transcriptómico relacionado a gametos infértiles con anomalías morfológicas como astenozoospermia y teratozoospermia, encontrando un total de más de 3'000 genes diferencialmente expresados.

De igual manera se lograron identificar los posibles procesos celulares y moleculares que se ven afectados en los hombres infértiles.

La alteración de diversos procesos como: la biosíntesis de lípidos que afecta potencialmente la permeabilidad y rigidez de la membrana celular, el metabolismo celular que potencialmente genera especies reactivas de oxígeno, la alteración en la generación y plegamiento incorrecto de proteínas. Afectan el potencial espermático para la fecundación de ovocito.

Así también se lograron identificar genes a nivel RNA que pudiesen fungir como marcadores moleculares para el desarrollo e implementación de métodos diagnósticos de hombre infértiles.

La identificación de estos marcadores moleculares nos permitirá desarrollar un método de diagnóstico molecular, rápido, sensible, específico y económico, permitiendo un mejor manejo e identificación del paciente que impactaría en la relación costo beneficio, tanto para el paciente como para la institución.

Con este estudio se disminuye la variabilidad subjetiva que se presenta en el seminograma.

El siguiente estudio a seguir sería determinar los genes que se expresaron a la alza y/o a la baja y determinar en muestras seminales si existe correlación con lo estipulado en el presente estudio y determinar fertilización y resultado reproductivo.

Referencias bibliográficas

1. Bracke, A., Peeters, K., Punjabi, U., Hoogewijs, D., & Dewilde, S. (2018). A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online* , 36 (3), 327-339.
2. Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Léandri, R. (2017). Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology* , 5 (5), 845-862.
3. Gurunath, S., Pandian, Z., Anderson, R., & Bhattacharya, S. (2011). Defining infertility a systematic review of prevalence studies. *Hum Reprod Update* , 17 (5), 575-588.
4. Krausz, C., Forti, G., & McElreavey, K. (2003). The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl* , 26 (2), 70-75.
5. O'Flynn-O'Brien, K., Varghese, A., & Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril* , 93 (1), 1-12.
6. Tahmasbpour, E., Balasubramanian, D., & Agarwal, A. (2014). A multifaceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J Assist Reprod Genet* , 31 (9), 1115-1137.
7. Sutovsky P., Moreno R. (2001), A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis, *Journal of Cell Science* 114, 1665-1675.
8. F. McLaren, J. (2012). *Infertility Evaluation. Obstetrics Gynecology Clinical of North America*, 453-63.
9. Gurunath, S., Pandian, Z., Richard, P. A., & Siladitya, B. (2011). Defining infertility-a systematic review of prevalences studies. *Human Reproduction update* , 575-88.
10. Hector, E. Chemes, V. Y. (2010). The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis. *Cell and tissue Research*, 349-57.
11. Jean-Ju Chung, S.-H. S. (2014). Structurally distinct Ca²⁺ signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility . *Cell*, 808-22.
12. Miller D, Ostermeier GC. (2006) Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update*;12:757-67.

13. Ward WS, Kimura Y, Yanagimachi R. (1999) An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. *Biol Reprod*;60:702–6.
14. Diaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A, et al. (2011) A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril*;95:50–60.
15. Pranav, P. Sujit, K. Rajender, S., (2017) Embryonic development of the testis, *Male infertility: Understanding Causes and treatment*, Springer, XV, 497 p. 57.
16. Armand, Z. Ashok, A. (2011). *Sperm Chromatin, Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. Springer Science p. 19 - 44.
17. Rex, A. (1999), *Spermatogenesis, overview*. *Encyclopedia of reproduction*, Vol 4. p. 534 - 545.
18. Debby, I. Maya, F. Haim, B. (2012), *Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases*, *Asian Journal of Andrology* 14, 816 - 821.
19. Patricia, S. Vanina, G. Mariana, W. (2016), *Acrosome Reaction as a Preparation for Gamete Fusion, Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization*, 9 p. 159 - 172.