

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
 7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
 8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
 - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaria de SAMeR: info@samer.org.ar

Estudio del núcleo espermático en la práctica clínica

Noelia Cabral^{1,2}, Mónica Faut¹, Agustina González Torres², Vanesa Rawe¹

¹ REPROTEC. Diagnóstico y Tratamiento Reproductivo. Buenos Aires, Argentina.

² CEBBAD. Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico.

Universidad Maimónides. Buenos Aires, Argentina.

Trabajo para optar por Premio SAMeR 2012-2013

Reproducción 2014;29:78-88

Resumen

Introducción. Durante la espermatogénesis las células germinales masculinas sufren un complejo proceso de remodelamiento nuclear en el cual la cromatina espermática reemplaza cerca del 85% de sus histonas testiculares por proteínas pequeñas y fuertemente básicas denominadas "protaminas". Este proceso es necesario no sólo para generar un núcleo hidrodinámico que permita el transporte de todo el genoma masculino a través del tracto reproductivo, sino también para proteger la información genética del ataque de nucleasas, especies reactivas del oxígeno (ROS) y mutágenos, que podrían inducir daño en el ADN. La disminución en el contenido de protaminas está ligada a una condensación incompleta o aberrante de la cromatina espermática y a una pobre integridad del ADN. Esta situación generaría un estado de "susceptibilidad de la cromatina" al ataque de agentes endógenos y exógenos que podrían

generar altos niveles de fragmentación en el ADN espermático. **Objetivo.** Evaluar la relación entre los niveles de empaquetamiento de la cromatina espermática, el grado de daño en el ADN y la presencia de marcadores apoptóticos en espermatozoides eyaculados. **Metodología.** Se analizaron 213 muestras de pacientes que consultaron por infertilidad y 86 donantes fértiles. La compactación de la cromatina fue determinada por cromomicina A3 (CMA3) y Azul de Anilina (AA), la fragmentación del ADN por el test de TUNEL con epifluorescencia y los niveles de apoptosis por Caspasa 3-Activa. Los datos se analizaron mediante tablas de contingencia 2x2 (Epidat 3.1), análisis de correlación de Pearson y test de Student (SPSS 16.0 para Windows; SPSS Inc., Chicago, IL). **Resultados.** Se encontró una correlación positiva entre los niveles de fragmentación espermática y el grado de compactación de la cromatina. De modo inverso, los valores de Caspasa 3-Activa correlacionaron negativamente con TUNEL. Además, se determinó el riesgo relativo de presentar valores alterados de TUNEL, en aquellas muestras con valores alterados de CMA3 y AA. Por otra parte, se

Correspondencia: Noelia Cabral
E-mail: noelia.edith.cabral@gmail.com

encontró que algunos de los parámetros seminales básicos se encuentran disminuidos al momento que los valores de TUNEL y CMA3 y AA están alterados. **Conclusión.** A lo largo de este trabajo se demostró la importancia que tienen los métodos de diagnóstico clásicos, como CMA3 y AA, para determinar la susceptibilidad de los espermatozoides al daño en el ADN, y cómo los parámetros seminales básicos están relacionados con estos niveles de daño. La importancia del estudio profundo de la gameta masculina reside en proveer nuevos conocimientos en el abordaje de los tratamientos en reproducción asistida.

Palabras claves. AFragmentación del ADN, TUNEL, cromatina espermática, infertilidad masculina.

Sperm nuclear study in the clinical practice

Summary

Introduction. During spermatogenesis, germinal cells suffer a complex nuclear remodeling in which 85% of testicular histones are replaced with small and basic proteins named protamines. This process is important and necessary to confer hydrodynamic shape and genetic information protection during transportation through the female tract. A poor content of protamines is related to incomplete or aberrant chromatin condensation and poor DNA integrity. This state could generate a "susceptibility state of chromatin" to endogenous and exogenous agents' attack that could enhance DNA fragmentation. **Aim.** To study the relationship between chromatin remodeling, DNA damage and apoptotic status of sperm samples. **Methodology.** Semen samples of 213 patients and 86 sperm donors were analyzed for chromatin packaging using Chromomycin A3 (CMA3) and Aniline Blue (AB), DNA fragmentation through TUNEL assay and apoptotic levels through the identification of active-Caspase-3 by immunocytochemistry. Data were analyzed with contingency tables (2x2) (Epidat 3.1), Pearson's correlation coefficient and Student's t-test (SPSS 16.0 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL). **Results.** When abnormal chromatin package is present, a positive correlation with high levels of DNA fragmentation is observed. The relative risk of showing high levels of DNA fragmentation on altered chromatin samples was determined. In addition to that, we found that

motility and sperm concentration were diminished when TUNEL were abnormal. **Conclusions.** We have shown the relationship between abnormal chromatin packing and DNA fragmentation. Likewise, we observed that some parameters such motility and sperm concentration are related with this damage. Our findings could be useful tools during the clinical search of the underlying male factor.

Key words. DNA fragmentation, TUNEL, sperm chromatin, men infertility.

Introducción

Durante la espermatogénesis, la cromatina espermática es organizada en un volumen significativamente menor que una célula somática. Para alcanzar este elevado nivel de compactación, el espermatozoide reemplaza sus histonas testiculares por proteínas pequeñas y fuertemente básicas llamadas protaminas.^{1,2} Estas proteínas contienen gran cantidad de aminoácidos básicos que le confieren una carga positiva neta.³ Los altos niveles de arginina y cisteínas facilitan una fuerte unión con el ADN y la formación de múltiples puentes disulfuros que son esenciales para el alto grado de empaquetamiento de la cromatina.⁴

El remodelamiento de la cromatina se produce de forma progresiva; las histonas somáticas primero son reemplazadas por variantes específicas del testículo, que luego son reemplazadas por proteínas de transición (TP1, TP2) en un proceso que involucra extensos rearrreglos en el ADN.

Finalmente, durante el estadio de espermátide elongada, las proteínas de transición son reemplazadas por protaminas, culminando así el remodelamiento molecular del genoma masculino durante la diferenciación del núcleo espermático.⁵

Las protaminas son las proteínas más abundantes en el núcleo espermático y se le han propuesto varias funciones, como ser la condensación del genoma paterno, generación de un núcleo hidrodinámico para el transporte del material hereditario, protección del mensaje genético paterno, marcas epigenéticas en algunas regiones del genoma, etc.¹⁻⁸

La deficiencia en protaminas está fuertemente asociada a alteraciones en la espermatogénesis y disminución en la calidad seminal y capacidad funcional.⁹ Alteraciones en la cantidad de Prota-

mina 1 y 2 (P1, P2) o su cantidad relativa (P1/P2) en pacientes infértiles impactan diferencialmente en el resultado de las técnicas de reproducción asistida,¹⁰ debido a que la disminución en el contenido de protaminas está ligada a una condensación incompleta o aberrante de la cromatina espermática y a una pobre integridad del ADN.¹¹ Esta situación generaría un estado de “susceptibilidad de la cromatina” al ataque de agentes endógenos y exógenos como nucleasas,¹²⁻¹³ radicales libres¹⁴⁻¹⁶ o mutágenos.

El daño en el ADN es un importante factor que determina una variedad de resultados clínicos adversos como fallas en la fertilización, bajo índice de implantación, disrupción de la implantación, pobre desarrollo embrionario e incremento de los abortos espontáneos.¹⁷⁻²⁶ Estas alteraciones del desarrollo están presuntamente asociadas con la transcripción defectuosa de los genes dañados en el genoma paterno.²⁷

La compactación incompleta de la cromatina y/o la persistencia de roturas en el ADN nuclear en espermatozoides eyaculados puede ser un signo de alteraciones en los procesos de reparación durante la protaminación o de la maduración incompleta durante la condensación de la cromatina; esta compactación deficiente promovería un estado de vulnerabilidad del núcleo frente al daño repercutiendo negativamente en la integridad genética de las células germinales y por tanto en el potencial reproductivo.

Avanzar en el conocimiento científico de estos procesos nos permitirá dar mayor robustez a las técnicas diagnósticas y aumentar la predictibilidad en los resultados de reproducción asistida.

Objetivo

Evaluar la relación entre los niveles de empaquetamiento de la cromatina espermática, el grado de daño en el ADN y la presencia de marcadores apoptóticos en espermatozoides eyaculados.

Materiales y métodos

El estudio incluye muestras de pacientes que consultaron por infertilidad al laboratorio *REPROTEC*TM para un análisis seminal por indicación médica (n=213) y muestras de hombres sanos, que se encuentran en el programa de donación de gametos de *REPROBANK*TM, banco de

semen (n=86). Las muestras fueron recolectadas por masturbación con 2-5 días de previa abstinencia sexual y analizada dentro de la primera hora post-obtención.

A partir de la muestra original se determinó el volumen (ml), la concentración espermática (x 10⁶ espermatozoides/ml), la movilidad progresiva (a+b), el pH y la viscosidad, siguiendo los criterios recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS).²⁸

Se tomaron alícuotas de las muestras seminales y se les realizaron los siguientes procedimientos:

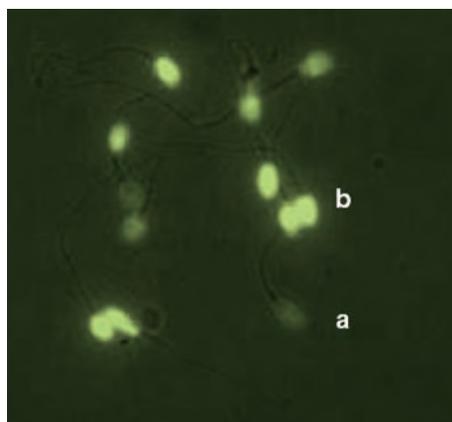
Evaluación de ausencia de protaminas por cromomicina A3 (CMA3)

La CMA3 es un fluorocromo que se ancla específicamente a regiones ricas en guanina-citosina y compete con las protaminas por los mismos lugares en el ADN,²⁹ por lo que está inversamente relacionado al estado de protaminación del núcleo espermático.³⁰

Las muestras fueron lavadas con PBS (*Sigma-Aldrich, P3813-10PAK*), fijadas con metanol (*Anebra Ref 6197*), teñidas con CMA3 (*Sigma-Aldrich, C2659*) y evaluadas bajo el microscopio de epifluorescencia (*Nikon Eclipse E200*) para su recuento.

Cuando los espermatozoides presentan una tinción verde intensa tras ser teñidos con CMA3, se interpreta que esa población celular muestra niveles bajos de protaminación o ausencia de esta proteína. Por el contrario, la tinción negativa se manifiesta por un color verde opaco (Figura 1).

Figura 1. Tinción con CMA3. Los núcleos maduros se ven de color verde opaco (a), mientras que los núcleos inmaduros (sin protaminas) se ven de color verde brillante (b). Fuente: Laboratorio *REPROTEC*.

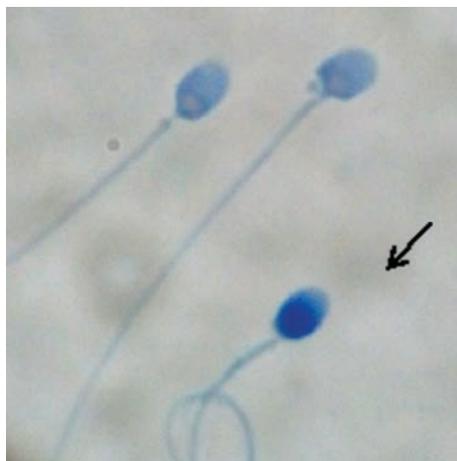


Evaluación de presencia de histonas testiculares por Azul de Anilina (AA)

La determinación de las histonas testiculares remanentes en el núcleo espermático, se puede realizar con el ensayo de Azul de Anilina. Esta tinción discrimina entre las histonas ricas en lisina y las protaminas ricas en arginina y cisteína,^{31,32} por lo que se puede utilizar para detectar defectos en la compactación o inmadurez cromatínica.

Las muestras espermáticas fueron lavadas con PBS, fijadas con metanol, teñidas con Azul de Anilina (BIOPUR, CI:42755) y evaluadas bajo microscopio óptico convencional para su recuento. Los núcleos de los espermatozoides inmaduros, ricos en histonas, contienen abundante lisina y reaccionan positivamente a la tinción tomando un color azul fuerte; mientras que los espermatozoides maduros, ricos en protaminas, con abundante arginina y cisteína no se tiñen (Figura 2).³³

Figura 2. Tinción con Azul de Anilina. Los núcleos inmaduros adoptan una tinción azul fuerte (flecha), mientras que los núcleos maduros no tienen fuerte afinidad por el colorante. Fuente: Laboratorio REPROTEC.

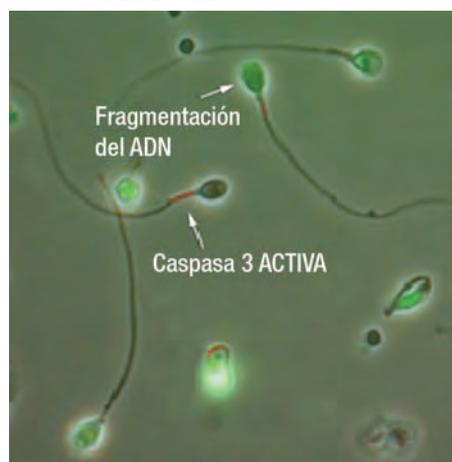


Evaluación de los niveles de fragmentación del ADN por ensayo de TUNEL

El test de TUNEL (*Terminal dUTP Nick-End Labeling*, sus siglas en inglés) permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos rotos existentes en el ADN, sean de simple o doble cadena. La reacción se cataliza *in situ* median-

te la acción de una enzima transferasa terminal que incorpora deoxiuridina modificada en el extremo OH-3' de la cadena afectada²⁹ (Figura 3).

Figura 3. Inmunocitoquímica en espermatozoides para TUNEL y Caspasa 3-Activa vista al microscopio de epifluorescencia. Fuente: Laboratorio REPROTEC.



Las muestras son enriquecidas o capacitadas previamente por la técnica de SWIM-UP, empleando H-HTF (*Human Tubal Fluid con Hepes*) suplementado con 15% de SSS, sustituto de suero sintético (*Irvine Scientific Ref.9922*) o gradiente de separación (*ISOLATE®*, *Irvine Scientific Ref.99264*) y se fijaron con formaldehído al 2% (*Sigma-Aldrich #F1635*) en PBS (*Sigma-Aldrich #P3813-10PAK*). Luego se incubaron con solución de TUNEL (*Kit Roche Applied Sci., cat. #11684795910*) siguiendo las especificaciones del fabricante. La evaluación se realizó al microscopio de epifluorescencia, contando al menos 500 espermatozoides por muestra.

Detección de procesos apoptóticos por inmunocitoquímica a través de Caspasa 3-Activa

Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas dependientes de aspartato que actúan como transductoras y efectoras de las señales apoptóticas durante la muerte celular programada. Dentro de esta familia existe una subfamilia de proteasas con función pro-apoptótica entre las cuales se encuentra la Caspasa-3. Esta proteína es la caspa-

sa efectora más importante en la señalización de la apoptosis y cuya activación implica un punto sin retorno hacia la muerte celular programada.³⁴ Por dicho motivo se la utiliza como marcador de apoptosis celular (Figura 3).

Las muestras enriquecidas por *SWIM-UP* o gradiente de separación se fijaron con formaldehído al 2% para realizar la inmunocitoquímica. Se utilizó anticuerpo primario anti-Caspasa 3-activa [Asp-175(5A1E), hecho en conejo, (*Cell Signaling mAb#966*)] y se reveló con anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra marcado con rodamina (*Alexa Fluor 568 A11011, Invitrogen*). Mediante el empleo de microscopio de epifluorescencia, se realizó el recuento.

Análisis estadístico

El análisis de *correlación de Pearson* y *T-test* se realizó mediante el uso del programa estadístico SPSS (*SPSS 16,0 para Windows; SPSS Inc., Chicago, IL*). Las tablas de contingencia 2x2 y *test* de Chi-cuadrado (χ^2) se analizaron mediante el programa de cálculo Epidat^{3,1}. Se determinó el valor de probabilidad (*P*), y el *odds ratio* (OR), para evaluar el grado de asociación entre las variables estudiadas.

Las gráficas de barra y de dispersión se realizaron con *Microsoft Excel 2010*.

Para el análisis de correlación se utilizaron variables continuas (en porcentaje) mientras que para las tablas de contingencia 2x2 y *test* de χ^2 fueron de tipo categóricas o cualitativas.

Resultados

Nota: Los valores de TUNEL, CMA3, AA y Caspasa 3-Activa fueron expresados como positivos (+) cuando sus valores superaban al valor de referencia (patológicos). De manera contraria, los valores negativos (-) fueron considerados como normales o no patológicos.

Poblaciones de estudio

Al evaluar los parámetros seminales básicos y los marcadores de integridad cromatínica (CMA3 y AA), de la población que consulta por infertilidad (n=213), encontramos una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control (n=86) (Tabla 1). Los pacientes tenían una concentración y movilidad espermática significativamente menor que el grupo control y además presentaban niveles de descompactación o inmadurez de la cromatina por encima del valor de referencia.

Además, en el grupo de pacientes se determinaron los valores de fragmentación del ADN y marcadores de apoptosis, a través de TUNEL (26,5 ± 18,1) y Caspasa (8,7 ± 10,0), respectivamente (Tabla 2).

Los valores observados entre los pacientes muestran gran dispersión. Esto se debe a la gran heterogeneidad de la población que consulta por infertilidad.

Compactación de la cromatina y fragmentación del ADN

Del total de muestras analizadas en los pacientes, el 78% (167/213) presentó valores de CMA3 alterada y el 56% (120/213) de TUNEL elevado (Tabla 3), mientras que en la población control solo el 30% (26/86) mostró valores de CMA3 alterada (Figura 4).

Resulta notorio observar que, dentro del grupo de pacientes con valores de CMA3 alterados, el

Tabla 2. Valores medios para TUNEL y Caspasa en pacientes que consultan por infertilidad. Los valores están expresados como la media ± el desvío estándar (DE).

	Media ± DE	Referencia
TUNEL	26,5 ± 18,1	≤ 20%
Caspasa-3	8,7 ± 10,0	≤ 11%

Tabla 1. Valores medios de los parámetros seminales en la población original. Los valores están expresados como la media ± el desvío estándar (DE). * WHO, 2010.

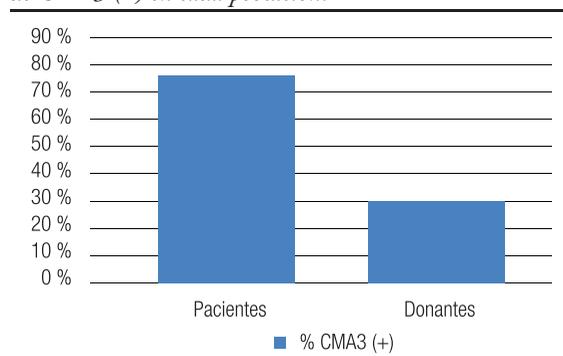
	Pacientes	Donantes	OMS 2010	p-value
Parámetros	Media ± DE	Media ± DE	Referencia	
Volumen eyaculado	2,7 ± 1,4	3,1 ± 1,3	>1,6 ml	0,009*
Concentración espermática (x 106/ml)	73,1 ± 59,3	113,2 ± 50,8	≥15x106/ml	0,000*
Espermatozoides motiles (a+b)	59,0 ± 20,6	72,2 ± 9,6	≥ 40%	0,000*
CMA3	36,4 ± 19,4	24,4 ± 16,9	≤ 30%	0,000*
Azul de Anilina	35,3 ± 16,5	28,7 ± 14,3	≤ 30%	0,001*

60% de ellos muestran valores de TUNEL anormal. Por otro lado, en la población con valores de CMA3 normales, el 59% de la misma presenta valores normales de TUNEL (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de pacientes que presentan valores de TUNEL y CMA3 patológicos (+) y normales (-). En paréntesis se representan los números absolutos.

Pacientes	TUNEL(+)	TUNEL(-)	Total
CMA3(+)	60% (101/167)	40% (66/167)	78% (167/213)
CMA3 (-)	41% (19/46)	59% (27/46)	22% (46/213)
Total	56% (120/213)	44% (93/213)	100% (213/213)

Figura 4. Porcentaje de individuos que presentan valores de CMA3 (+) en cada población.



El análisis estadístico empleando χ^2 para estas variables, mostró un valor de 5,39 con $P = 0,02$. El *odd ratio* (OR) calculado fue 2,17 con un intervalo de confianza (IC 95%) de 1,11 – 4,22. Esto indicaría que la ausencia de protaminas (CMA3 +) constituiría un factor de riesgo para desarrollar valores de TUNEL patológicos (mayores al 20%). Los pacientes cuyos valores de CMA3 son patológicos (mayores al 30%) presentan un riesgo 2,17 veces mayor de presentar fragmentación del ADN respecto de aquellos con valores de CMA3 normales.

Sumado a esto, cuando los valores de CMA3 se encuentran por encima del 50%, la proporción de pacientes con valores patológicos de TUNEL asciende al 78,8% (Tabla 4).

El coeficiente de correlación de Pearson (r) demostró que existe una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre los valores de TUNEL y CMA3 ($r = 0,231$; $P < 0,01$). La gráfica de dispersión (Figura 5) y el análisis de regresión lineal esquematizan esta correlación mostrando esta tendencia.

En relación al segundo marcador de integridad cromatínica, Azul de Anilina (AA), se encontró que el 81% (173/213) de la población de pacientes en estudio presentó valores patológicos de histonas testiculares en el núcleo espermático (Tabla 5), mientras que en la población control solo el 33% (29/86) de ellos presentaban valores patológicos (Figura 6).

Tabla 4. Porcentaje de pacientes que presentan valores de TUNEL patológicos (+) cuando los niveles de CMA3 supera el 50%. En paréntesis se representan los números absolutos.

Pacientes	TUNEL(+)	TUNEL(-)	Total
CMA3>50%	78,8% (41/52)	21,2% (11/52)	100% (52/52)

Figura 5. Gráfica de correlación entre CMA3 y TUNEL.

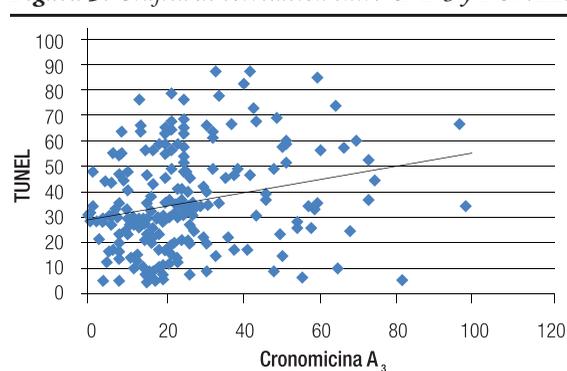
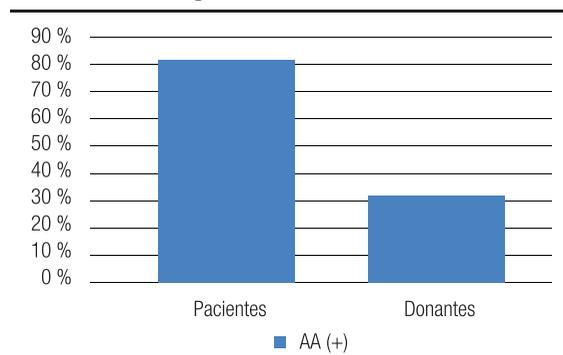


Tabla 5. Porcentaje de pacientes que presentan valores de TUNEL y AA patológicos (+) y normales (-). Entre paréntesis se representan los números absolutos.

Pacientes	TUNEL(+)	TUNEL(-)	Total
AA (+)	61% (106/173)	39% (67/173)	81% (173/213)
AA (-)	35% (14/40)	65% (26/40)	28% (40/213)
Total	56% (120/213)	37% (93/213)	100% (213/213)

Figura 6. Porcentaje de individuos que presentan valores de AA (+) en cada población.



Al igual que para el caso de CMA3, se observa que el 61% de los pacientes que poseen valores de AA patológicos presentan, simultáneamente, valores de TUNEL alterados. Y además, cuando los valores de AA eran superiores al 50%, el porcentaje de pacientes que presentaban valores de TUNEL patológico ascendía al 74,3%. Esto podría esperarse si consideramos que tanto la tinción con AA (presencia de histonas testiculares) como la tinción con CMA3 (ausencia de protaminas) son técnicas que determinan de modos diferentes un mismo estado (núcleo “inmaduro”), por lo tanto, las marcas positivas de ambas técnicas deberían presentarse simultáneamente.

El valor χ^2 obtenido para la frecuencia de TUNEL positivo en pacientes con y sin valores de AA alterado fue de 9,11 con un valor $P = 0,003$. El OR calculado fue 2,93 con un intervalo de confianza (IC 95%) de 1,43– 6,02. Esto indicaría que la remanencia de histonas testiculares constituiría un factor de riesgo para desarrollar valores de TUNEL patológicos en aquellos individuos con defectos en la remodelación cromatínica (núcleo inmaduro). Los hombres cuyos valores de AA son patológicos (mayores al 30%) poseen un riesgo 2,93 veces mayor de presentar fragmentación del ADN respecto de aquellos con valores de AA normales. Estos resultados sugerirían la existencia de una vulnerabilidad mayor del ADN a ser dañado, en aquellos espermatozoides cuya cromatina no se encuentre densamente compactada.

El coeficiente de correlación de Pearson (r) demostró que, al igual que con CMA3, existe una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre los valores TUNEL y AA ($r=0,278$; $P < 0,01$) (Tabla 6).

La gráfica de dispersión de la Figura 7 y el análisis de regresión lineal esquematizan esta correlación.

Cabe aclarar, que si bien se encontró una correlación estadística para ambas técnicas, el valor clínico que podemos establecer es limitado, ya que no representa una relación lineal contundente. En este caso, el análisis de riesgo (OR), nos proporciona información clínica más robusta.

Dado que en este trabajo se utilizaron dos técnicas para determinar un mismo proceso (la compactación de la cromatina), se ha tratado de comprender cómo se relacionan ambos eventos estudiando la correlación entre ambas técnicas.

El análisis de correlación de Pearson demostró que existe una relación altamente significativa entre ambas técnicas, demostrando una asociación positiva con un $r=8,65$ para un $P < 0,0001$. La gráfica de dispersión esquematizó esta fuerte correlación (Figura 8).

Esta correlación resulta de gran importancia en la práctica clínica, ya que pone a disposición procedimientos fáciles y económicos que nos permiten evaluar el estado madurativo del núcleo. Además, corrobora, de manera significativa, la utilización de dos técnicas complementarias en la medición indirecta de un mismo estado.

Tabla 6. Correlación entre porcentaje de CMA3, AA y TUNEL. La correlación es significativa al nivel $P < 0,01$ (**).

Correlación	% TUNEL	
	r	p
% Cromomicina A3	0,231**	0,001
% Azul de Anilina	0,196**	0,004

Figura 7. Gráfica de correlación entre AA y TUNEL.

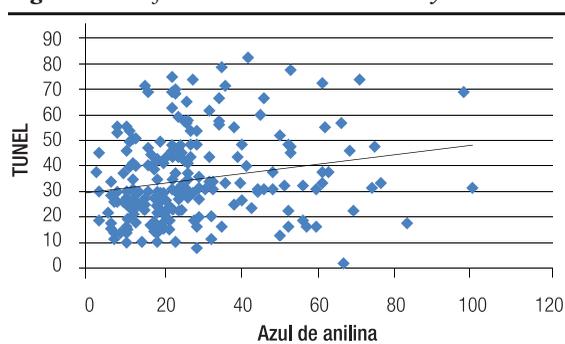
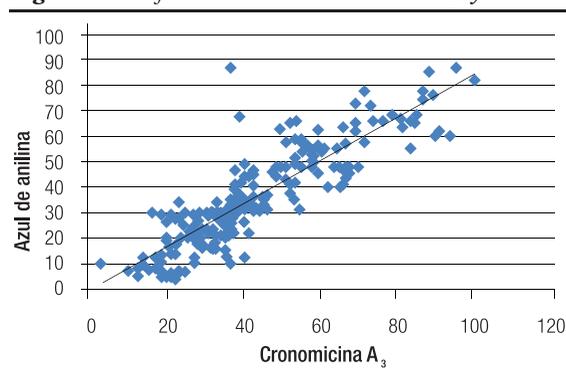


Figura 8. Gráfica de correlación entre CMA3 y AA.

TUNEL, CMA3, AA y Caspasa 3-Activa

En el análisis, no se ha encontrado una correlación entre los valores de Caspasa y los marcadores de integridad cromatínica ($r=-0,047$; $P < 0,05$ para Azul de Anilina y $r=-0,003$; $P < 0,01$ para CMA3); sin embargo, fue significativa entre los niveles de TUNEL y el porcentaje de espermatozoides apoptóticos medidos por Caspasa 3-activa ($r=-0,223$; $P < 0,001$). Es esperable suponer un escenario en el que la dinámica de ambos marcadores sea diferente ya que la activación de caspasas, enmarcada en este evento dinámico, ocurre como un evento previo a la fragmentación y por tanto pueden o no ser simultáneos en el tiempo si consideramos la muestra como un todo.

Parámetros seminales básicos y fragmentación del ADN

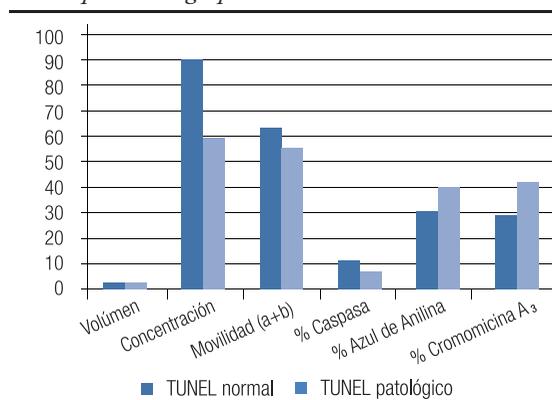
A lo largo de este trabajo, nos hemos preguntado sobre la existencia de algún parámetro seminal básico al cual prestar atención y que nos diera un indicio de una posible afección a nivel del ADN espermático. Para dar respuesta a esta cuestión, agrupamos a los pacientes en dos grupos: aquellos con valores de TUNEL normales y aquellos con valores de TUNEL

patológicos, y comparamos los valores medios de los parámetros seminales para cada grupo (Figura 9).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos de pacientes en lo relativo a la concentración espermática ($t=3,97$; $P < 0,001$), el porcentaje de espermatozoides móviles ($t=2,86$; $P < 0,01$), los valores de AA ($t=-4,88$; $P < 0,001$), CMA3 ($t=-5,25$; $P < 0,001$) y los niveles de Caspasa 3-activa ($t=3,10$; $P < 0,01$) (Tabla 7).

Esto indicaría que tanto la concentración de espermatozoides como su movilidad progresiva (a+b) se encuentran significativamente disminuidas en aquellos pacientes cuyos valores de TUNEL están alterados. Y, como era de esperar, en base a los resultados mostrados anteriormente, los valores de CMA3 y AA también muestran diferencias significativas.

De este modo, sería interesante prestar especial atención a aquellos pacientes con oligoastenospermia, ya que tendrían mayor tendencia a sufrir defectos en la compactación cromatínica y como consecuencia un mayor riesgo de afectaciones a nivel del ADN espermático.

Figura 9. Comparación entre pacientes con y sin valores de TUNEL patológicos. Las barras representan los valores medios para cada grupo.**Tabla 7.** Comparación de los parámetros seminales, MIC y Caspasa en las poblaciones con y sin valores de TUNEL patológicos. Los valores están expresados como la media \pm el desvío estándar (DE).

	TUNEL normal	TUNEL patológico	T-test	
	Media \pm DE	Media \pm DE	t	p-value
Volumen eyaculado	2,7 \pm 1,4	2,6 \pm 1,4	0,316	0,752
Concentración espermática (106/ml)	90,8 \pm 61,3	59,3 \pm 54,2	3,970	0,000*
Movilidad (a+b)	63,6 \pm 16,7	55,5 \pm 22,6	2,865	0,005*
CMA3	29,0 \pm 16,1	42,2 \pm 19,8	-5,250	0,000*
Azul de Anilina	29,3 \pm 13,2	40,0 \pm 17,4	-4,884	0,000*
Caspasa-3	11,1 \pm 12,5	6,9 \pm 7,0	3,104	0,002*

Discusión

La infertilidad afecta a casi el 20% de las parejas en edad reproductiva y los defectos en la función espermática son una de las principales causas de infertilidad masculina.²⁴

Como se mencionó anteriormente, diversos autores han señalado que los defectos en el remodelamiento de la cromatina tienen impacto sobre la integridad genética de la línea germinal y sobre su *performance* reproductiva, teniendo como consecuencias fallas durante la fecundación y el desarrollo embrionario.^{35,36} Sin embargo, es importante tener en cuenta que existen otras razones para la disminución de la integridad del ADN como ser, una recombinación alterada, apoptosis abortiva, actividad anormal de topoisomerasas y reparación anómala durante la espermatogénesis.³⁷

La potencial relación entre los defectos en la protaminación y la disminución en la integridad del ADN ha sido abordada por diferentes grupos usando una variedad de aproximaciones directas e indirectas. Gran parte de las evidencias relacionan altos índices de fragmentación del ADN obtenidos con SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) con bajos resultados de ICSI (*Intra-Cytoplasmic Sperm Injection*) y FIV (Fecundación *In Vitro*).^{38,39} Del mismo modo, otros grupos han encontrado una correlación negativa entre las tasas de fecundación *in vitro* y los niveles de protaminación determinados con CMA3.^{40,41} Subsecuentemente, este grupo demostró que la fragmentación del ADN, determinado por ensayo cometa, es más frecuente en espermatozoides con niveles altos de CMA3.⁴²

Aoki y col (2005) demostraron que la integridad del ADN estaba comprometida con la deficiencia de protaminas, determinadas directamente a través de electroforesis. Los autores mostraron que los índices de fragmentación espermática (DFI), determinados por *DNA Integrity Assay*, fueron significativamente más elevados en pacientes con baja relación Protamina 1/Protamina 2, y que este índice se encuentra correlacionado negativamente con la concentración de P1, P2 y con la concentración total de Protaminas.¹⁴

Consistente con estas observaciones, los resultados de nuestro trabajo mostraron una fuerte correlación ($P < 0,01$) entre el grado de empaquetamiento de la cromatina determinado por CMA3 y AA, y el grado de fragmentación del ADN, de-

terminado por TUNEL. Además, se mostró que las alteraciones en los niveles de compactación de la cromatina constituyen un factor de riesgo para desarrollar valores de TUNEL patológicos. De este modo, el correcto remodelamiento de la cromatina espermática jugaría un rol fundamental en la maduración del espermatozoide durante la espermatogénesis y determinaría la vulnerabilidad que sufriría éste al ataque de agentes endógenos y exógenos que pueden dañar su material genético.

Como el remodelamiento de la cromatina es un proceso dinámico donde como punto de inicio se produce una desorganización núcleo-histónica a través de modificaciones postraduccionales y posterior reemplazo por protaminas, podríamos inferir que la remanencia de histonas testiculares marcaría un proceso defectuoso de remodelamiento que inhibe el reemplazo por protaminas.^{3,6} En el presente trabajo, el análisis de correlación de Pearson (r) demostró una asociación positiva entre los valores de CMA3 y AA. Esto confirmaría el proceso dinámico que sufre el espermatozoide durante la espermatogénesis, al demostrar el reemplazo consecutivo de las proteínas histónicas por protaminas durante el remodelamiento del material genético. De este modo, la presencia de histonas testiculares en el núcleo espermático se encuentra inversamente correlacionada con la presencia de protaminas.

Tanto CMA3 como AA, al ser técnicas sencillas de realizar, son muy útiles como marcadores diagnósticos en la práctica clínica. Ambas pueden ser empleadas como herramientas predictivas para determinar el estado madurativo del núcleo espermático y evaluar la vulnerabilidad que tendrán los núcleos frente al daño del ADN. En nuestro programa de donación de semen, usamos estos marcadores de manera rutinaria como evaluación preliminar del núcleo espermático.

Parámetros seminales básicos e Integridad del ADN

Diversos autores reconocen que existe una correlación negativa entre la calidad espermática (movilidad, concentración, vitalidad) e índices de fragmentación del ADN,⁴³⁻⁴⁵ lo que condice con los resultados obtenidos en este trabajo y corrobora esa hipótesis.

Hemos observado que el grado de fragmentación del ADN y la concentración espermática

correlacionan de manera inversa; y aquellos hombres con valores de TUNEL alterado tienen en promedio menor concentración espermática que aquellos que tienen valores normales. Esto puede deberse a que altos valores de fragmentación espermática tienden a desencadenar un deterioro en la espermatogénesis,²⁵ induciendo muchas veces el proceso de apoptosis y, reduciendo así el número efectivo de gametos que pueden ser eyaculados. De modo similar, la pérdida de movilidad puede relacionarse con modificaciones en la constitución molecular de la membrana plasmática, que también se vería afectada por el ambiente hostil (presencia de nucleasas o especies reactivas de oxígeno) a las que generalmente están expuestas las gametas en estas condiciones. Gandini y cols observaron una relación similar entre los niveles de apoptosis y los parámetros seminales básicos,⁴⁶ lo que se condice con nuestros resultados.

En nuestro estudio, el volumen eyaculado no mostró diferencia significativa entre los grupos con TUNEL patológico y no patológico. Esto es de esperarse, ya que el mismo está determinado por las secreciones de las glándulas anexas y no por la cantidad de células germinales presentes.⁴⁷

Consideraciones finales

Tradicionalmente, el diagnóstico de la infertilidad masculina estaba basado principalmente en la evaluación microscópica de la concentración, movilidad y morfología espermática, como indicadores de la calidad y capacidad reproductiva de los pacientes. Aunque estos parámetros nos brindan información sumamente importante, el valor del espermograma en términos de potencial fértil o su valor predictivo en técnicas de reproducción asistida es limitado.

La introducción de nuevas metodologías y/o técnicas, como TUNEL, así como la revalorización de técnicas clásicas, como la determinación de CMA3 o AA, nos permiten abordar el diagnóstico andrológico de manera más integral y con nuevos enfoques para mejorar la práctica clínica.

Referencias

- Balhorn R, Cosman M, Thornton K. Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In *The male gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. Cache River Press 1999; 55-70.
- Braun R. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 2001; 28(1):10-12.
- Oliva R. Protamine and male infertility. *Human Reproduction Update* 2006; 12(4): 417-435.
- Carrell D, Emery B, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction Update* 2007;13(3):313-327.
- Sassone-Corsi P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 2002; 296(5576):2176-2178.
- Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010;139:287-301.
- Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2007; 5(36): 1-36.
- Aoki V, Carrell D. Human protamines and the developing spermatid: their structure, function expression and relationships with male infertility. *Asian Journal Andrology* 2003; 5:315-324.
- Carrell D, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 2001; 22(4):604-610.
- De Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballecà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril* 2009; 91(3):715-722.
- García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Jones C, Coward K, Gosálvez J, Benet J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril* 2011; 95(1):105-109.
- Sotolongo B, Lino E, Ward W. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod* 2003; 69(6):2029-2035.
- Sakkas D, Álvarez J. Sperm DNA fragmentation: mechanism of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility* 2009.
- Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006; 21(4):986-993.
- Aitken R, De Luliis G, Finnie J, Hedges A, McLachlan R. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction* 2010; 25(10):2415-2426.
- Gharagozloo P, Aitken J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction* 2011;26 (7):1628-1640.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19:1401-1408.

18. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger T. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81:965-972.
19. Virro M, Larson-Cook K, Evenson D. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004; 81:1289-1295.
20. Lewis S, Aitken R. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005; 322(1):33-41.
21. Perez-Crespo M, Moreira P, Pintado B, Gutierrez-Adan A. Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice. *J Androl* 2008; 29:47-54.
22. Jauniaux E, Farquharson R, Christiansen O, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2006; 21(9):2216-2222.
23. Raj R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006; 368: 601-611.
24. Aitken R, De Iuliis G. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007;14:727-733.
25. Aitken R, Findlay J, Hutt K, Kerr J. Apoptosis in the germ line. *Reproduction* 2011;141:139- 150.
26. Zini A, Boman J, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23(12):2663-2668.
27. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004;19:611-615.
28. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. WHO Press, World Health Organization. 2010.
29. Cortez-Gutierrez E, Davila-Rodriguez M, Lopez-Fernandez J, Fernandez J, Gosalvez J. Evaluación del daño del ADN espermático. *Actas Urológicas Españolas* 2007;31(2):120-131.
30. Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi P, Bianchi U, Mariethoz E, Sakkas D. In-situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(2):127-132.
31. Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune J. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* 1990;13(6):452-462.
32. Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 1991; 6(7):979-982.
33. Hammadeh M, Hamad M, Montenarh M, Fischer-Hammadeh C. Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Human Reproduction* 2010; 25 (11): 2708-2720.
34. Grunewald S, Sharma R, Paasch U, Glander H, Agarwal A. Impact of caspase activation in human spermatozoa. *Microscope Research and Technique* 2009; 00.
35. Esterhuizen A, Franken D, Lourens J, Prinsloo E, Rooyen L. Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Human Reproduction* 2000;15(3):657-661.
36. Nasr-Esfahani M. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. *Reproductive Biomedicine Online* 2007;14(4):422-429.
37. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi G. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(4):428-432.
38. Evenson D, Darzynkiewicz Z, Melamed M. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210(4474):1131-1133.
39. Evenson DP, Wixon R. Comparison of the Halosperm test kit with the sperm chromatin structure assay (SCSA) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil Steril* 2005; 84(4):846-849.
40. Nasr-Esfahani M, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 2005;11(2):198-205.
41. Nasr-Esfahani M, Salehi M, Razavi S, Mardani M, Bahramian H, Steger K, Oreizi F. Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online* 2004;9(6):652-658.
42. Nasr-Esfahani M. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. *Reproductive Biomedicine Online* 2007;14(4):422-429.
43. Irvine, D, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, Aitken R. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal Androl* 2000;21:33-44.
44. Tomlinson M, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001;16(10):2160-2165.
45. Huang C, Lin D, Tsao H, Cheng T, Liu C, Lee M. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005;84:130-140.
46. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15(4):830-839.
47. Geneser F. *Histología. Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición.* 2006;22:638-662.