

INFERTILIDAD MASCULINA. CONSUMO DE TABACO Y SU RELACIÓN CON FRAGMENTACIÓN DEL ADN Y APOPTOSIS ESPERMÁTICA TEMPRANA

¹Paparella C., ¹Pavesi A., ²Provenzal O., ²Ombrella A., ²Luciano M., ¹Rodriguez A., ¹Bouvet B. ¹Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. ²Facultad de Ciencias Médicas - UNR

RESUMEN

El humo del cigarrillo contiene sustancias tóxicas generadoras de especies reactivas del oxígeno (ERO) induciendo la fragmentación del ADN y la ocurrencia de eventos apoptóticos. En el espermatozoide humano la localización de fosfatidilserina (FS) en la membrana plasmática externa es un indicador de apoptosis temprana y se puede visualizar utilizando microscopio de fluorescencia y anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína. Nuestro objetivo fue evaluar en hombres con infertilidad idiopática el efecto del consumo de tabaco sobre la integridad del ADN nuclear y su relación con eventos apoptóticos tempranos en los espermatozoides. Se incorporaron al estudio 76 hombres que consultaron por infertilidad en el Servicio URHMA (Unidad de Reproducción Humana Médicamente Asistida) del Hospital Provincial del Centenario de Rosario. Se excluyeron varones con factores de riesgo asociados al incremento de daño al ADN espermático. Se formaron dos grupos: G_F (n= 30) hombres fumadores de más de 20 cigarrillos por día y G_{NF} (n= 46) varones no fumadores. Se realizó espermograma y estudios funcionales espermáticos (OMS, 2010). La integridad del ADN se evaluó con el test naranja de acridina (NA). Para determinar las células en apoptosis temprana se utilizó un kit comercial *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (AV). Se aplicó la prueba *t*- Student para comparar entre ambos grupos las variables analizadas. Se obtuvieron los siguientes resultados: NA (% espermatozoides con ADN nativo) G_F= 55.81 ± 6.22; G_{NF}= 83.0 ± 6.28; p < 0.0001. AV (% espermatozoides anexina V positivo) G_F= 27.5 ± 5.97; G_{NF}= 14.4 ± 2.93; p < 0.0001. Existe diferencia significativa entre ambos grupos al evaluar la fragmentación del ADN nuclear y la apoptosis espermática temprana. El consumo de tabaco induce la fragmentación del ADN y eventos apoptóticos en los espermatozoides alterando la calidad seminal y debe ser un factor a considerar cuando se estudia la infertilidad masculina.

PALABRAS CLAVE: tabaco, infertilidad masculina, fragmentación del ADN, apoptosis espermática, espermatozoide

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define infertilidad como la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales sin protección (1). Los problemas de infertilidad afectan aproximadamente al 20 % de las parejas en edad reproductiva y sus causas pueden presentarse de forma unitaria o multifactorial. El factor masculino está involucrado en alrededor del 50 % de las parejas infértiles, 30 % sólo por factor masculino y 20 % son causas compartidas (2, 3, 4).

La contaminación química del ambiente es un problema mundial, muchos productos químicos naturales y sintéticos de uso cotidiano al ser liberados al medioambiente interactúan con los seres vivos ocasionando daños agudos o crónicos a la salud humana general y en especial a la salud reproductiva (5, 6). El humo del cigarrillo es un contaminante ambiental que contiene sustancias tóxicas como la nicotina generadoras de especies ERO. En hombres fumadores las EROS alteran la regulación del proceso espermatogénico aumentando el riesgo de fragmentación del ADN espermático y la ocurrencia de eventos apoptóticos (7, 8).

Los espermatozoides debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana plasmática son susceptibles al daño oxidativo. Estudios recientes demostraron que las mitocondrias son generadoras de EROS; previo al desarrollo de la cascada apoptótica generan elevados niveles de anión superóxido cuyo efecto oxidativo se incrementa por la incompetencia del espermatozoide para contrarrestar el daño oxidativo por su escaso citoplasma y los bajos niveles de enzimas antioxidantes. Este proceso induce una cascada de profundos cambios degradativos que afectan la organización y función de la membrana espermática (9, 10).

El estilo de vida paterno constituye un importante factor de riesgo para la transmisión a la descendencia de mutaciones de *novo* en el ADN. El hábito de fumar cigarrillos se correlaciona con un aumento significativo en la frecuencia de mutaciones que son detectadas también en la descendencia. Estos estudios revelan que el tabaco es un mutágeno que se identifica en la línea germinal humana (11, 12).

El espermograma brinda información sobre la función espermatogénica y esteroideogénica de los testículos y la capacidad funcional de las glándulas sexuales anexas pero no revela los defectos en la integridad del genoma espermático (13, 14, 15). Un espermatozoide con movilidad y morfología normales pero que presenta roturas en su material genético de tipo mono o bicatenario, puede fecundar a un ovocito e incorporar su carga genética dañada afectando el proceso de desarrollo del embrión, del feto e incluso la posibilidad de obtener un embarazo viable (16, 17, 18).

La transferencia de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al óvulo es decisiva para conseguir una fecundación con ciertas perspectivas de éxito. La fragmentación del ADN espermático puede ocurrir durante el proceso espermatogénico o cuando la gameta masculina transita los conductos excretores (15).

En espermatozoides humanos la externalización de FS de la membrana plasmática, la activación de caspasa-3 y la disminución del potencial de membrana mitocondrial son indicadores tempranos de apoptosis. La translocación de FS en la superficie espermática puede visualizarse con anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (anexina V-FITC) mediante microscopía de fluorescencia. La anexina V es una proteína dependiente de calcio con alta afinidad por la FS (19).

OBJETIVO

Evaluar en hombres con infertilidad idiopática el efecto del consumo de tabaco sobre la integridad del ADN nuclear y su relación con eventos apoptóticos tempranos en los espermatozoides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se trabajó con muestras seminales de 76 hombres con edades entre 18 y 42 años que consultaron por infertilidad en el Servicio URHMA del Hospital Provincial Centenario de Rosario durante los meses de noviembre de 2014 a diciembre de 2015. Se excluyeron varones con factores de riesgo asociados al incremento de fragmentación del ADN espermático tales como: varicocele, criptorquidia, episodios febriles, teratozoospermia severa, tratamientos con citostáticos, exposición a agroquímicos, solventes y sustancias tóxicas. Las muestras de semen

se obtuvieron por masturbación luego de 3 a 5 días de abstinencia sexual, se realizó espermograma por método subjetivo y estudios funcionales espermáticos según normas OMS 2010 (13). Se formaron dos grupos: G_F (n= 30) hombres fumadores de más de 20 cigarrillos por día y G_{NF} (n= 46) varones no fumadores. Los fumadores lo hacían desde más de 7 años.

ADN espermático

La integridad del ADN espermático se evaluó con naranja de acridina (NA) utilizando microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 50i Japon). Este ensayo mide la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización ácida inducida por el fluorocromo y se cuantifica mediante el cambio metacromático del color verde (ADN nativo) al anaranjado (ADN desnaturalizado). Se trabajó con una alícuota de semen fresco que se incubó en cámara húmeda con NA y se evaluó el porcentaje de espermatozoides con ADN nativo mediante microscopía fluorescente (20).

Apoptosis espermática temprana

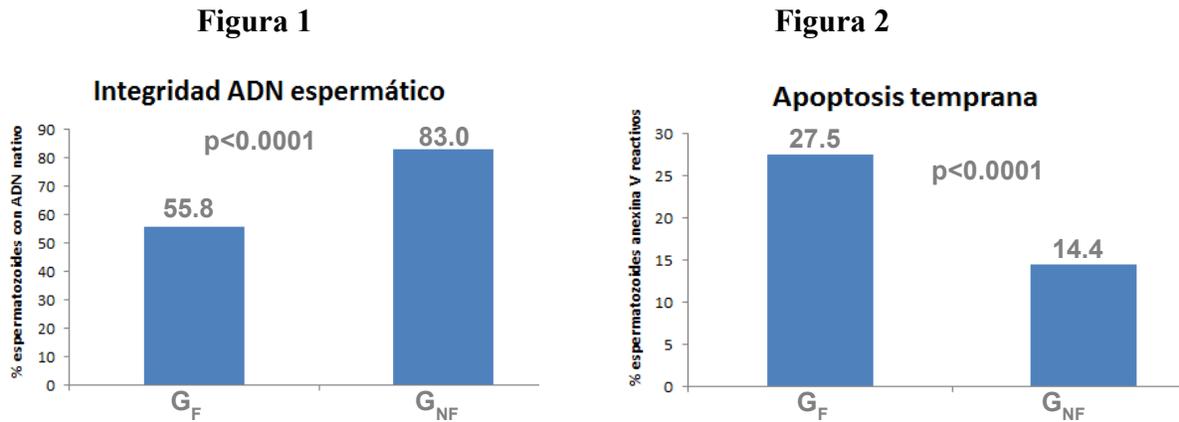
Para determinar apoptosis espermática temprana se utilizó anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*). La unión de anexina V-FITC a los residuos de FS expuestos en la membrana externa de las células preapoptóticas muestra una tinción verde fluorescente. El ioduro de propidio (IP) incorporado a la técnica permite diferenciar las células viables con y sin translocación de FS de las necróticas que proporcionan fluorescencia roja. Se trabajó con muestras de semen fresco de concentración espermática de un millón por ml, se incubaron en solución de Annexin V-FITC con adición de IP. Se determinó con microscopio fluorescente (Nikon Eclipse 50i Japon) el porcentaje de espermatozoides en apoptosis temprana que muestran fluorescencia verde (Anexina V positivo) y el porcentaje de células necróticas o en apoptosis tardía que emiten fluorescencia roja (IP positivo) (21).

ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis de comparación de los promedios de las variables estudiadas entre ambos grupos se realizó aplicando la prueba *t*-Student.

RESULTADOS

El grupo de varones fumadores presentó menor porcentaje de espermatozoides con ADN nativo (Figura 1) y un aumento en la proporción de células en apoptosis temprana (Figura 2).



DISCUSIÓN

La integridad del ADN es fundamental para el normal desarrollo embrionario. El daño en la molécula de ADN espermático es una causa importante de infertilidad y además un riesgo latente de transmitir defectos genéticos a la descendencia, en especial cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida en las que no es posible realizar una selección para excluir células con material genético dañado. La generación excesiva de ERO y las fallas en el proceso espermatogénico ocasiona daño irreversible en el ADN de los espermatozoides (22). El consumo de tabaco es uno de los factores de naturaleza exógena que aumenta la producción de ERO y contribuye a incrementar la fragmentación del ADN espermático (8). Varios autores observaron una estrecha relación entre el incremento de ERO y la apoptosis espermática con el consecuente daño del ADN (17).

Además se demostró que el hábito paterno de fumar cigarrillos, previo a la concepción, causa roturas de la doble cadena del ADN en la sangre del cordón umbilical de la descendencia. Estas alteraciones transgeneracionales en el ADN de los padres se pueden convertir en mutaciones y alteraciones de la estabilidad genómica en la descendencia (23, 24).

En coincidencia con los hallazgos de otros investigadores, nuestros resultados demuestran que el tabaco daña la calidad espermática del hombre. Las sustancias tóxicas que se encuentran en

los cigarrillos como la nicotina, producen fragmentación del ADN y este material genético lesionado induce el inicio de la cascada apoptótica que altera la fecundación (25, 26).

CONCLUSIÓN

En hombres consumidores de tabaco, la toxicidad de la nicotina condiciona a la célula espermática para sufrir fragmentación del ADN y eventos apoptóticos, alterando la viabilidad y el proceso de fertilización de los espermatozoides. La investigación de los sucesos de apoptosis temprana y la evaluación de la integridad del ADN nuclear espermático son ensayos de aplicación en el Laboratorio Andrológico que permiten obtener información relevante cuando se realiza el estudio del factor masculino en la pareja infértil.

BIBLIOGRAFÍA

1. Weiyuan Cui, Mother or nothing: the agony of infertility. *Bull World Health Organization*. 2010; 88: 881–882.
2. Cruz L., Colmenares M., Berrueta-Carrillo L., Gomez-Perez R., Montes H., Berrueta L., y col. Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen. *Invest Clin*. 2010; 51 (1): 87-99.
3. Elder K., Dale B. *In vitro Fertilization* 3th ed. New York, *Cambridge University Press*. 2011; 277.
4. Tapia S. R. Una visión actual de la infertilidad masculina. *Rev Mex Reprod* 2012; 4 (3): 103-109.
5. Skinner M. K., Manikkam M., Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reproductive Toxicology*. 2011; 31: 337-343.
6. Varayoud J., Ramos J. G., Bosquiazzo V. L., Lower M., Muñoz de Toro M., Luque E. H. Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology*. 2011; 152: 1101-1111.
7. Bouvet B., Paparella C., Feldman R. Estrés oxidativo y su efecto sobre la calidad seminal. *Rev Habanera de Cs. Med*. 2007; 6 (4): 1-4.
8. Bouvet B., Paparella C., Feldman R. Efecto del tabaquismo sobre la espermatogénesis en hombres con infertilidad idiopática. *Arch Esp Urol*. 2007; 60 (3): 273-277.

9. Shen H. M., Dai J., Chia S. E., Lim A., Ong C. N. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod.* 2002; 17(5): 12-73.
10. Koppers A. J., Manohar L., Aitken R. J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radical Biol Med.* 2010; 48 (1): 112-119.
11. Demarini D. M. Declaring the existence of human germ cell mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.* 2012. 53: 166–172.
12. Linschooten J.O., Verhofstad N., Gutzkow K., Olsen A.K., Yauk C., Oligschlager Y., et al. Paternal lifestyle as a potential source of germ line mutations transmitted to offspring. *FASEB J.* 2013; 27 (7): 2873-2879.
13. World Health Organization WHO 2010. *Laboratory manual for the examination and processing of human sperm 5th ed.* Cambridge University Press. Cambridge. Pp. 1-114.
14. Morelli S. S., Seungdamrong A., Mc Culloh D. H., Mc Govern P. G. Abnormal sperm count and motility on semen analysis are not sufficiently predictive of abnormal Kruger morphology. *Fertility and Sterility.* 2010; 94 (7): 2882-2884.
15. López-García, M. J., Urbano-Felice, A., y Cárdenas-Povedano, M. *Manual de Laboratorio para análisis de semen.* Omnia Science. Omnia Publisher S.L. 2012. Pp. 2-10.
16. Avendaño C., Franchi A., Taylor S., Morshedi M., Bocca S., Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009; 91(4): 1077-1084.
17. Sakkas D, Alvarez J G. Fragmentación del ADN espermático, mecanismos de origen, repercusión en los resultados reproductivos y análisis. *Rev Mex Reprod.* 2011; 3 (4): 160-175.
18. Sanchez Sierra E. M., Olalez Hernandez J. R., Ávila Campos A., Lopez Martinez L., Sanchez Rodriguez S. H. Alteraciones en el semen de pacientes con problemas de infertilidad. *Arch de Medicina.* 2014; 10 (1): 2-17.
19. De Vantéry Arrighi C., Lucas H., Chardonnens D., De Agostini A. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7:1.

20. Tejada R. I., Mitchell J. C., Norman C., Marich J., Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange fluorescence. *Fertil Steril*. 1984; 42 (1): 87-91.
21. Uriondo H., Alvarez Sedó C., Gil M. V., Frazer P., Serna J., Nodar F. Niveles de correlación entre la externalización de fosfatidilserina y apoptosis espermática en pacientes con infertilidad masculina. *Reproducción*. 2011; 26 (3): 111-116.
22. Paparella C. V., Pavesi A. B., Feldman R. N., Bouvet B. R. Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. *Arch Med Interna del Uruguay*. 2015; 37 (1): 7-14.
23. Laubenthal, J., Zlobinskaya, O., Poterlowicz, K., Baumgartner, A., Gdula, M. R., Fthenou, E., Keramarou, M., Hepworth, S. J., Kleinjans, J. C., van Schooten, F. J., Brunborg, G., Godschalk, R. W., Schmid, T. E., and Anderson, D. Cigarette smoke induced transgenerational alterations in genome stability in cord blood of human F1 offspring. *FASEB J*. 2012; 26: 3946-3956.
24. Aitken R. J. and Koppers A. J. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J. Androl*. 2011; 13: 36-42.
25. Góngora-Rodríguez A., Sanchez-Gonzalez S., Cubillos-García S., Cuneo-Pareto S. Fragmentación del ADN del espermatozoide y su influencia en la fertilidad de la pareja. *Rev Mex Med Rep*. 2011; 3 (3): 105-111.
26. Davar R., Sekhvat L., Naserzadeh N. Semen parameters of non infertile smoker and non smoker men. *J Med Life*. 2012. 5(4): 465-468.