



Revista Internacional de
Andrología

www.elsevier.es/andrologia



COMUNICACIONES ORALES

**V Congreso Iberoamericano de Andrología (ANDRO)
VI Congreso de la Sociedad Argentina de Andrología (SAA)**

Buenos Aires, Argentina, 19-21 de abril de 2012

Área básica

**EXPRESIÓN DE FOSFOLIPASA C ZETA (PLC ZETA)
EN ESPERMATOZOIDES DE PACIENTES CON FALLA
DE FERTILIZACIÓN REPETIDA LUEGO DE ICSI**

C. Álvarez Sedó, M.V. Gil, H. Uriondo, S. Papier y F. Nodar

*Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGyR).
Buenos Aires. Argentina.*

La proteína PLC zeta espermática, componente de la teca perinuclear, ha sido caracterizada como la responsable de la activación ovocitaria durante la fecundación en mamíferos. El objetivo del trabajo fue evaluar la expresión de la proteína PLC zeta en ocho parejas infériles (16 ciclos), que realizaron 2 intentos de ICSI cada una (factor masculino severo), con tasas de fertilización 0-10%. Los ovocitos no fertilizados (todos los ciclos) fueron analizados por inmunocitoquímica (ICQ) para evaluar: activación citoplasmática ($\alpha\beta$ -tubulinas), maduración citoplasmática (pCdc2) y ADN (Hoechst). Durante el segundo intento de ICSI, se tomó una fracción de las muestras espermáticas y se procesó para ICQ y western blot (WB). Se utilizó el anticuerpo policlonal anti-PLC zeta, y para WB se realizó la inmunodetección además con el anticuerpo anti-tubulina (control de carga). Los controles fueron muestras de semen de dos varones con fertilidad comprobada. La edad promedio de las mujeres fue de 33,2 años (30-36 años), con niveles hormonales normales (FSH, LH, PRL) y una adecuada reserva ovárica. Los ovocitos con falla de fertilización luego de ICSI mostraron en todos los casos ausencia de activación citoplasmática y falla de descondensación del ADN paterno. Se observó una adecuada maduración citoplasmática y conformación de la metafase en todos los ovocitos. Las muestras se caracterizaron como: asteno-teratozoospermia (dos), oligo-teratozoospermia (tres), teratozoospermia (tres). La localización de la proteína PLC zeta es ecuatorial y post acrosomal. El análisis de WB evidenció que tres de las muestras problema presentaron 4-6 veces menor cantidad de la proteína PLC zeta respecto a los varones controles, las cinco muestras restantes no evidenciaron diferencias. La

infertilidad y bajas tasas repetidas de fertilización (ICSI), en pacientes en los que la calidad ovocitaria no se encuentra comprometida, podría en algunos casos deberse a la disminución en la proteína PLC zeta, aunque aún hace falta determinar cuáles son los mecanismos asociados a esta anomalía.

**ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO, ULTRAESTRUCTURAL
Y PROTEÓMICO DE LA BIOGÉNESIS DEL ACROSOMA
EN GLOBOZOOSPERMIA**

C. Álvarez Sedó^{1,2}, V.Y Rawe^{3,4} y H.E. Chemes¹

¹Laboratorio de Fisiología y Patología Testicular.

²Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). División de Endocrinología. Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez".

Buenos Aires. Argentina. ³Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGyR). Buenos Aires. Argentina. ⁴REPROTEC.

Buenos Aires. Argentina. ⁴CREA. Medicina de la Reproducción. Valencia. España.

La biogénesis de acrosoma es un evento importante en la diferenciación de las espermátidas tempranas que depende de la adecuada interacción entre las vesículas proacrosomales derivadas del Golgi y la envoltura nuclear. La teca perinuclear (TP) es un complejo proteico cuya función ha sido relacionada a la formación-desarrollo del acrosoma en numerosas especies de mamíferos. El presente trabajo tuvo como objetivo esclarecer los mecanismos fisiopatológicos en el desarrollo, estructura y características bioquímicas del acrosoma y de la TP en células germinales y espermatozoides de pacientes con globozoospermia y compararlas con varones fértiles. Se analizaron espermatozoides de cinco varones con globozoospermia y seis fértiles, y células germinales a partir de biopsias testiculares de un paciente con globozoospermia y tres con espermatozoogénesis completa (azoospermia obstructiva). Las muestras fueron evaluadas mediante microscopía electrónica de transmisión, inmunofluorescencia y "Western blot". En la espermatozoogénesis normal, el desarrollo del acrosoma depende de la correcta formación de vesículas proacrosomales y de la simultánea modificación de la envoltura nuclear. Las proteínas de la TP se

inmunolocalizaron de manera consistente en la membrana de las vesículas proacrosomales y por debajo del acrosoma al formarse y expandirse sobre la superficie nuclear. En varones fértiles la TP está compuesta de seis proteínas (16-22-29-34-50-68 kDa). En pacientes con globozoospermia, se observaron alteraciones en la formación de las vesículas proacrosomales y la presencia de estructuras paranucleares, multivesiculares-multilamelares, que resultan en acrosomas poco desarrollados o disociados de la envoltura nuclear. Las proteínas de la TP, presentaron una localización ectópica (citoplasmática) no relacionada con el acrosoma en formación. El análisis proteómico evidenció, por primera vez en la literatura, una significativa disminución en las seis proteínas de la TP en globozoospermia. Concluimos que las alteraciones observadas durante la biogénesis del acrosoma en globozoospermia, son consecuencia de anomalías del aparato de Golgi que alteran el desarrollo de las vesículas proacrosomales, produciendo una significativa deficiencia de los componentes de la TP, lo que interfiere en la biogénesis del acrosoma. Estos hallazgos demuestran un rol fundamental de la TP en la correcta formación, implantación y expansión del acrosoma sobre el núcleo de la espermátida.

FXYD5 SE EXPRESA DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS Y EN EL ESPERMATOZOIDE Y TIENE UN ROL EN LA MOTILIDAD DE LA GAMETA MASCULINA. ESTUDIOS EN EL MODELO MURINO

N.Y. Edelsztein¹, M.F. Veiga¹, L. Lapycky¹, H. Chemes², M. Venara² y M.H. Vazquez-Levin¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (IBYME-CONICET).

²Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CEDI-E-CONICET). Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez”. Buenos Aires. Argentina.

Introducción: FXYD5 ha sido propuesta como proteína reguladora de la Na,K-ATPasa en estudios realizados en riñón murino. En el espermatozoide, la actividad de la Na,K-ATPasa es esencial para la motilidad, pero las proteínas que la modulan aún no han sido caracterizadas. Recientemente, nuestro grupo reportó la expresión de FXYD5 en la gonada y espermatozoide humanos y su co-localización con la Na,K-ATPasa (Fertil Steril, 2011).

Objetivos: Caracterizar la expresión y localización de FXYD5 en el testículo y espermatozoide de ratón y evaluar su rol como modulador de la motilidad espermática.

Metodología: 1) Estudio de la expresión de transcriptos de FXYD5 (retro-transcripción y PCR/RT-PCR), 2) Inmunodetección de FXYD5 (“Western Immunoblotting”/WIB) y localización en tejidos y gametas (inmunohistoquímica e inmunocitoquímica), 3) Evaluación de la participación de FXYD5 en la motilidad espermática (ensayos en presencia de anticuerpo anti-FXYD5).

Resultados: Los estudios de RT-PCR revelaron la expresión de FXYD5 en el testículo, identificándose la presencia de 3 transcriptos. Mediante WIB se detectó una forma predominante de ~66 kDa en el testículo y en espermatozoides epididimarios, hallándose además formas de menor peso molecular. Los ensayos de inmunohistoquímica revelaron una señal específica para FXYD5 con localización en el acrosoma y flagelo de espermátides redondas y elongadas. Los estudios de inmunocitoquímica sobre espermatozoides del *cauda* epididimario revelaron una señal específica y mayoritaria (> 85%) para FXYD5 en el acrosoma y flagelo. El tratamiento con el anticuerpo anti-FXYD5 produjo alteraciones en la motilidad, reflejadas en un aumento del 55% del porcentaje de espermatozoides con motilidad *in situ* respecto de los mótiles totales, a los 60 minutos de incubación.

Conclusiones: Éste es el primer trabajo que describe la detección de FXYD5 en el testículo y espermatozoide murinos y presenta

evidencias de su posible rol en la motilidad espermática. Nuestros resultados y los antecedentes de la literatura nos permiten proponer a FXYD5 como un modulador de la Na,K-ATPasa.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE MODIFICACIONES EN HISTONAS ASOCIADAS A CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN CÉLULAS GERMINALES Y ESPERMATOZOIDES

F.A. La Spina¹, M. Romanato¹, S. Brugo Olmedo², S. de Vincentiis², J.C. Calvo¹ y M.G. Buffone^{1,2}

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET. Buenos Aires. Argentina. ²Centro Médico Seremas. Buenos Aires. Argentina.

Las células germinales masculinas de mamíferos sufren una extensa reestructuración cromatínica y de su epigenoma durante la espermogénesis. El reemplazo de histonas por protaminas conduce a la pérdida de ciertos componentes epigenéticos. Sin embargo, estudios recientes en espermatozoides humanos demostraron una pequeña proporción de histonas que contiene ciertas modificaciones epigenéticas asociadas a promotores de genes importantes para el desarrollo embrionario. Además, estas alteraciones epigenéticas pueden ser causales de muchas patologías. Por lo tanto, nuestro objetivo fue estudiar la presencia de marcas epigenéticas en diferentes estadios de la espermogénesis: espermatoцитos paquitene, espermátides redondas y condensadas y espermatozoide maduro para comprender cómo se desarrollan estos fenómenos. Se utilizaron espermatozoides humanos de donantes normospérmicos (OMS) y para el análisis de células germinales, ratones CF1. El examen por inmunofluorescencia indirecta reveló que durante la espermogénesis, las células germinales van perdiendo la mayor parte de las marcas epigenéticas en la histona 3 asociadas a una transcripción activa como también la acetilación en la histona 4 que solo se observa en espermatoцитos en paquitene y luego desaparece. Esto supondría la hiperacetilación que sufre la célula en ese estadio para distender la cromatina y realizar el intercambio de histonas por protaminas. El análisis del perfil de histonas modificadas en el espermatozoide maduro reveló señal nuclear para las distintas modificaciones epigenéticas en histonas asociadas a la metilación, principalmente en espermatozoides con morfología anormal, y ausencia de señal para las acetilaciones de las histonas 3 y 4. Comparando la presencia de marcas epigenéticas en núcleos espermáticos humanos entre poblaciones diferenciadas por su morfología, observamos mayor marca positiva en la población de buena calidad que en la de mala calidad. Esto indicaría que la retención de marcas epigenéticas estaría asociada a la calidad espermática y, por lo tanto, puede tener relevancia en ciertos casos de infertilidad asociados a patología espermática.

ESTUDIOS SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE CADHERINA NEURAL EN EVENTOS DE ADHESIÓN DURANTE LA INTERACCIÓN DE LAS GAMETAS

C.I. Marín Briggiler, M.F. Veiga, M.R. del Pozo y M.H. Vazquez-Levin

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (IBYME-CONICET). Buenos Aires. Argentina.

Introducción: La cadherina neural (cadN) es una glicoproteína de membrana que participa en eventos de adhesión y señalización celular dependientes de iones calcio. Evidencias previas de nuestro laboratorio han demostrado la localización de cadN en ovocitos y espermatozoides humanos en regiones involucradas en la interacción de las gametas.

Objetivos: Evaluar la participación de cadN en la interacción espermatozoide-oolema.

Metodología: Se realizó el ensayo heterólogo de penetración de ovocitos de hámster desprovistos de zona pellucida con espermatozoides humanos. El ensayo fue realizado en presencia de un anticuerpo políclonal (H-63, 20 µg/ml) o monoclonal (GC-4, 200 µg/ml) dirigido contra cadN; además, las gametas fueron incubadas con un péptido activo específico de cadN o con uno inactivo (5 mM) provistos por la firma Adherex (Research Triangle Park, NC; EEUU). Se realizaron incubaciones con medio de cultivo como control.

Resultados: La incubación de las gametas con los anticuerpos anti cadN resultó en una disminución ($p < 0,01$) del porcentaje de ovocitos penetrados (control 100% versus H-63: 42 ± 6%; control: 100% versus GC-4: 51 ± 11%; media ± EEM). La preincubación de los ovocitos con el péptido activo, pero no con el inactivo, produjo un aumento ($p < 0,05$) en el % de penetraciones (control 100% versus péptido activo: 239 ± 58%; control: 100% versus péptido inactivo: 118 ± 33%); dicho efecto no fue observado cuando los ovocitos fueron lavados antes de la inseminación. No se encontraron diferencias en el número de espermatozoides unidos al oolema, en el porcentaje de espermatozoides móviles ni reaccionados, como tampoco en el porcentaje de ovocitos muertos entre las condiciones tratadas y controles.

Conclusiones: Los resultados sugieren la participación de cadN en eventos de adhesión/fusión de las gametas. Estudios futuros contribuirán a dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes y confirmar el rol de cadN en la fecundación.

EFFECTO DE N-ACETIL-L-CISTEÍNA EN ESPERMATOZOIDES BOVINOS Y EN EL DESARROLLO Y CALIDAD DE EMBRIONES GENERADOS POR INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

L. Pérez^{1,2}, C. Arias^{1,2}, P. Loren^{1,2}, J. Risopatrón², R. Sánchez² y R. Felmer^{1,2}

¹Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de La Frontera. Temuco. Chile. ²Centro de Biotecnología de la Reproducción (BIOREN-CEBIOR). Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera. Temuco. Chile.

La utilización de semen criopreservado en la producción *in vitro* de embriones bovinos, influye negativamente en la calidad y desarrollo embrionario, debido al aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y a la mayor fragmentación del ADN que se ha observado. Este efecto es especialmente relevante en la técnica ICSI, en donde no existe una selección natural de espermatozoides competentes, y un espermatozoide con daños en su ADN puede ser inadvertidamente utilizado y fecundar un ovocito, reflejándose un efecto deletéreo en las posteriores etapas del desarrollo embrionario o en la implantación del embrión. En el presente estudio básico se determinó las propiedades antioxidantes de N-acetil-L-cisteína (NAC) en espermatozoides bovinos, para lo cual se evaluó mediante citometría de flujo el efecto de 2 concentraciones (1 y 10 mM) en la fragmentación del ADN, formación de ROS y viabilidad de los espermatozoides. Los resultados indican que aunque no se observó un efecto de NAC en la fragmentación o en viabilidad de los espermatozoides, su utilización tiene un efecto negativo, aumentando la producción de ROS. Adicionalmente, se evaluó el efecto de NAC en el desarrollo y calidad de embriones bovinos generados por ICSI. La utilización de NAC mejoró la calidad, medido por el mayor número de células observado, y la tasa de desarrollo embrionario, medido por el mayor número de embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto, aunque este efecto no fue significativo. En conclusión, el tratamiento de espermatozoides por 1 hora con concentraciones de NAC de 1 y 10 mM,

no tiene un efecto positivo sobre la viabilidad, integridad del ADN y formación de ROS. Sin embargo, su utilización en ICSI tiene un efecto positivo mejorando el desarrollo y la calidad de los embriones, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OCLUDINA Y ALTERACIÓN DE LA BARRERA HEMATOTESTICULAR (BHT) EN RATAS CON ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE)

C.V. Pérez, C. Sobarzo, M.S. Theas, B. Denduchis y L. Lustig

Instituto de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Se acepta que la inflamación del tracto genital masculino es un factor o co-factor importante de infertilidad. El modelo de OAE, útil para el estudio de la patogenia de la inflamación testicular, se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfomonocitario intersticial y daño severo de los túbulos seminíferos (TS) que presentan apoptosis y descamación de las células germinales. El objetivo de este trabajo es explorar la funcionalidad de la BHT durante el desarrollo de la OAE, analizando la expresión y localización de las proteínas que forman parte de las uniones estrechas que la componen. Se indujo OAE en ratas por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes. Ratas del grupo control (C) fueron inyectadas sólo con adyuvantes, estudiándose también ratas sin tratar (N). Observamos por inmunofluorescencia y Western blot una reducción significativa en la expresión de ocludina en el testículo de las ratas con OAE focal y severa. Por inmunofluorescencia observamos una deslocalización de claudina-11 y ZO-1 en el testículo de las ratas con OAE comparado con las ratas C. Concomitante con los cambios en la expresión de las moléculas de adhesión celular detectamos un aumento de la permeabilidad de la BHT, ya que los trazadores inyectados en las ratas con OAE difundieron hacia el compartimento adluminal del TS a diferencia de las ratas C y N. La vía de señalización p38 MAPK está involucrada en la regulación de la dinámica de las uniones estrechas entre células de Sertoli ya que detectamos un aumento de la forma fosforilada de p38 en el testículo de las ratas con OAE. Resultados preliminares parecen indicar que citoquinas pro-inflamatorias cuyo nivel está aumentado en el microambiente testicular en la OAE estarían modulando, entre otros factores, la dinámica de las uniones estrechas, alterando la funcionalidad de la BHT y la integridad del TS.

LA APERTURA DEL POZO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL SE ASOCIA CON FRAGMENTACIÓN DEL DNA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS EYACULADOS

F. Treulen^{1,2}, P. Uribe^{1,2}, R. Boguen^{1,2} y J. Villegas^{2,3}

¹Programa Doctorado en Ciencias, Mención Biología Celular y Molecular Aplicada. ²Centro de Excelencia de Biotecnología de Reproducción-BIOREN. ³Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera. Temuco. Chile.

El pozo de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) es un importante regulador de la mitocondria durante la muerte celular y su apertura sostenida produce alteración del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y fragmentación del DNA en células somáticas. Los índices de fragmentación del DNA espermático se asocian con infertilidad masculina y con el riesgo de transmisión de material genético anormal a la descendencia ya que los espermatozoides con DNA fragmentado mantienen su capacidad fecundante. Se ha asociado estrés

oxidativo por ROS con fragmentación del DNA espermático, sin embargo, no está claro si espermatozoides humanos eyaculados pueden experimentar un proceso intrínseco que culmine con la fragmentación del DNA. El objetivo de este trabajo fue evaluar si espermatozoides humanos eyaculados, sometidos a condiciones de apertura del PTPm, experimentan un incremento en la producción de ROS y fragmentación del DNA. Para esto, espermatozoides de donantes con espermograma normal fueron tratados con ionomicina durante 4 horas a 37 °C. Para evaluar la apertura del PTPm se utilizó el método calceína-AM/cobalto. Se evaluó la producción de anión superóxido intracelular con la tinción DHE/SYTOX y la fragmentación del DNA con la técnica de TUNEL. Todas las evaluaciones fueron realizadas por citometría de flujo (BD FACSCanto II) y los datos fueron analizados con el software Summit 4.3. Los espermatozoides tratados con ionomicina evidenciaron una disminución significativa en la fluorescencia de calceína mitocondrial, demostrando la apertura del PTPm. Esto se acompañó de un aumento en el porcentaje de células con niveles elevados de ROS y con el DNA fragmentado. La apertura del PTPm en espermatozoides humanos eyaculados se asocia a producción aumentada de ROS y a fragmentación del DNA, de manera similar a lo observado en células somáticas.

LOCALIZACIÓN DE SITIOS DE UNIÓN DE LACTOFERRINA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS. INHIBICIÓN DE LA UNIÓN A ZONA PELÚCIDA

C. Zumoffen, A. Caille, M.J. Munuce y S. Ghersevich

Laboratorio de Estudios Reproductivos. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

Encontramos que lactoferrina (LF) presente en el fluido oviductal humano podía interaccionar con espermatozoides. Se localizaron los sitios de unión de LF en espermatozoides y se evaluó el efecto de LF en la interacción de los espermatozoides con la zona pelúcida (ZP). A partir de donantes normozoospérmicos se seleccionaron espermatozoides móviles (swim up) que fueron incubados 1 h en presencia de LF-FITC, antes o después de ser incubados bajo condiciones capacitantes por 5h e inducir la reacción acrosómica (RA) utilizando fluido folicular. Las imágenes se analizaron en un microscopio confocal. Se obtuvieron ovocitos de descarte donados por pacientes de programas de fecundación *in vitro*. La unión a la ZP se evaluó incubando los ovocitos con espermatozoides homólogos y en presencia o ausencia de distintas concentraciones de LF (0-100 µg/ml) por 4 h. Al cabo de las incubaciones se determinó microscópicamente el número de espermatozoides que permanecieron unidos a la ZP. Se observaron 3 patrones de tinción de LF-FICT en los espermatozoides: sin marca (SM), tinción en toda la cabeza (C), y segmento ecuatorial y zona post-acrosomal (SE/PA). Los espermatozoides que fueron capacitados y expuestos a fluido folicular (SM: 27,7 ± 4,1%, C: 11,6 ± 3,2%, SE/PA: 60,7 ± 5,4%) presentaron un patrón de tinción diferente que en los no capacitados (SM: 62,6 ± 2,3%, C: 34,6 ± 2,9%, SE/PA: 2,6 ± 0,6%). La unión a la ZP fue inhibida en forma dosis-dependiente en presencia de LF, aún con la menor concentración (0,1 µg/ml, p < 0,01 vs control). Los distintos patrones de tinción de la proteína sobre espermatozoides antes y después de incubación en condiciones de capacitación indican una relocalización de LF durante estos procesos. Los resultados sugieren una posible participación de LF en el proceso de interacción entre gametas.

Área clínica

ANDROGENOTERAPIA DE MEJOR IMPACTO

S. Aszpis, P. Slavinsky, A. Rodríguez, P. Otero, E. Mormandi y O. Levalle

Sección de Andrología. División de Endocrinología. Hospital Durand. Buenos Aires. Argentina.

Objetivos: Al tratamiento con testosterona (T) se le atribuyen alteraciones del perfil lipídico y otros factores de riesgo cardiovascular. Algunas evidencias sugieren un rol causal a los niveles circulantes de T alcanzados con el reemplazo hormonal a largo plazo. Nuestro objetivo fue comparar en varones hipogonádicos los efectos clínicos y metabólicos inducidos con diferentes andrógenos: enantato de T (ET) i.m., T transdérmica (TT) y undecanoato de T (UT) i.m.

Metodología: Se evaluó la respuesta al tratamiento en 170 varones hipogonádicos ($T < 3 \text{ ng/ml}$) de amplio rango etario [86 con ET: $32,8 \pm 16,7$ (17-77 años); 50 con TT: $38,8 \pm 17,5$ (17-79 años) y 34 con UT: $42,3 \pm 17,2$ (17-68 años)] y similar índice de masa corporal (IMC) [(ET: $26,7 \pm 6,9$, TT: $25,8 \pm 4,5$ y UT $27,8 \pm 5,5$)]. Se compararon las variables antropométricas, hemáticas, lipídicas y hepáticas, la insulino-resistencia y el impacto prostático, en condiciones basales y al año de tratamiento. Análisis estadístico: test de t para muestras pareadas y no pareadas, y análisis de varianza a 2 colas (ANOVA).

Resultados: La T incrementó tanto el estradiol y la prolactina, como el hematocrito y la hemoglobina, pero en rango fisiológico. En todos, aumentó el IMC (basal: $26,7 \pm 6$ y post: $27,5 \pm 6,1$; $p < 0,05$) y descendió el perímetro cintura (basal: $96,9 \pm 11,8$ y post: $92,9 \pm 10,8$; $p < 0,01$). El HDL descendió solo bajo ET, en cambio el colesterol total con UT. Los triglicéridos aumentaron con ET y disminuyeron con TT y UT. El HOMA se redujo en todos, pero la insulina no disminuyó en el grupo ET. Finalmente, las transaminasas y el PSA aumentaron solo en este último grupo.

Conclusiones: A diferencia del ET, las nuevas formulaciones de T (TT y UT) mejoran los parámetros de riesgo cardiovascular con menor impacto hepático y prostático, probablemente por su farmacocinética que reproduce niveles fisiológicos de T y no los suprafisiológicos post ET.

ESTUDIO DE FRAGMENTACIÓN DE ADN EN ESPERMATOZOIDES CON DIFERENTES MORFOLOGÍAS. VALOR PREDICTIVO EN TRATAMIENTOS DE ICSI

C. Avendaño

Nascentis Medicina Reproductiva. Córdoba. Argentina. LEBE. Puerto Madryn. Chubut. Argentina.

El uso de espermatozoides con ADN dañado puede tener un efecto negativo sobre los resultados de reproducción asistida. Generalmente la fragmentación de ADN (fADN) es evaluada en la totalidad de los espermatozoides sin importar sus características morfológicas. Sin embargo en ICSI, solo los espermatozoides morfológicamente normales serán utilizados para ser inyectados. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de fADN en espermatozoides con diferentes morfologías y definir si la evaluación de la fADN en el total de los espermatozoides puede impactar en los resultados de ICSI. Se utilizaron muestras de semen de 31 pacientes infériles con más de 10% de espermatozoides fragmentados. Se utilizó el ensayo de TUNEL para la evaluación de la fADN. Se realizó evaluación simultánea de morfología y fADN por con-

traste de fase y fluorescencia, respectivamente. La morfología espermática fue clasificada de la siguiente forma: normal (N), amorf (A), piriforme (P), vacuulado (V), acintado (T), pequeño (S) y redondo (R). Se evaluaron 2.945 células con ADN fragmentado. El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado fue el siguiente: 56,2% A, 22,9% V, 7,8% T, 6,3% R, 5,7% P y 1,1% N. Cuando se estudió los espermatozoides normales, el 31% presentaba el ADN fragmentado. Estos resultados demuestran que la mayoría de las células con ADN dañado tienen morfología anormal. La mayor anormalidad morfológica observada fue A y V. Los espermatozoides normales fueron escasos en el total de fADN. En ICSI solo espermatozoides con forma normal serán injectados por lo que la evaluación del ADN en células anormales podría suministrar valores predictivos erróneos. Se propone que la evaluación de la integridad del ADN en espermatozoides morfológicamente normales es una mejor estrategia para evaluar el impacto de la fADN en los resultados de ICSI que la evaluación en la totalidad de los espermatozoides.

LA SUPERÓXIDO DISMUTASA ESPERMÁTICA ES UN BUEN PREDICTOR DE LA RECUPERACIÓN DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA LUEGO DE LA CRIOPRESERVACIÓN

M.G. Buffone^{1,3}, J.C. Calamera², S. Brugo Olmedo³,
S. de Vincentiis³, M.M. Calamera², G.F. Doncel⁵ y J.A. Álvarez⁴

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET. Buenos Aires. Argentina. ²Laboratorio de Estudios en Reproducción (LER). Buenos Aires. Argentina. ³Centro Medico Seremas. Buenos Aires. Argentina. ⁴Instituto Marqués. Barcelona. España. ⁵Contraceptive Research and Development (CONRAD). Department of Obstetrics and Gynecology. The Jones Institute for Reproductive Medicine. Eastern Virginia Medical School. Norfolk. Virginia. EE.UU.

La criopreservación de espermatozoides humanos es un procedimiento importante en reproducción asistida de baja y alta complejidad. Durante el proceso de congelación y descongelación, los espermatozoides son expuestos a un estrés que en algunos casos, resulta en una pobre recuperación de la movilidad espermática post-descongelación. Los mecanismos por los cuales, algunos individuos sufren este problema no ha sido dilucidado, pero evidencias previas sugieren que un importante incremento en la producción de sustancias oxígeno reactivas (ROS) al momento de la descongelación podría ser un factor importante en este fenómeno. Nuestro objetivo fue investigar si los espermatozoides con mayor contenido de superóxido dismutasa (SOD), una de las enzimas más importantes para la protección contra las ROS, presentan una mayor recuperación de la movilidad post-descongelación. Para ello, se estudiaron 42 individuos normospermáticos que eran evaluados como potenciales donantes para un banco de semen. Se midió el contenido de SOD en los espermatozoides sin fraccionar, en los espermatozoides de mejor calidad (pellet de gradiente de ISolate; F90) y en el plasma seminal. Además, se evalúo la recuperación de la movilidad espermática posterior a la descongelación. Se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre la recuperación de la movilidad post-descongelación y el contenido de SOD en los espermatozoides de F90. A su vez, se observó una correlación negativa entre la recuperación de la movilidad y el contenido de SOD en la muestra sin fraccionar. Estos resultados sugerirían que la SOD en los espermatozoides de mejor funcionalidad es un buen predictor de la recuperación espermática post-descongelación. Este resultado podría contribuir a mejorar los métodos de selección de donantes para un banco de semen.

NIVELES DE TESTOSTERONA TOTAL Y BIODISPONIBLE EN PACIENTES CON DISTINTOS GRADOS DE ENFERMEDAD METABÓLICA

P.R. Costanzo, S. Suárez y P. Knoblovits

Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear.
Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

Introducción: Diversos estudios demostraron mayor prevalencia de hipogonadismo y menores niveles de testosterona (T) en pacientes con diabetes tipo 2(DM2).

Objetivos: 1) Evaluar valores de T total (TT) y biodisponible (TB) en pacientes con DM2 y sujetos sin DM2; 2) Comparar los valores de TT y TB en pacientes con DM2, síndrome metabólico(SM), insulino-resistencia (IR) y sujetos normales y 3) Evaluar los niveles de TT y T según el grado de control metabólico de la DM2.

Metodología: Se incluyeron 67 pacientes con DM2 y 92 sin DM2 (44 con SM, 24 con IR sin SM y 24 normales). Se evaluó: índice de masa corporal (IMC), perímetro de cintura (PC), TT, TB, glucemia, insulina y HbA1C. Se definió SM según criterios ATPIII e IR con índice HOMA (IR = HOMA > 3).

Resultados: Los pacientes con DM2 tuvieron menores niveles de TB vs sujetos sin DM2: $1,47 \pm 0,5$ vs $1,83 \pm 0,6$ ng/ml ($p = 0,004$). Los sujetos normales presentaron mayores valores de TT: $5,7 \pm 2,1$ ng/ml y TB: $2,09 \pm 0,6$ ng/ml vs pacientes con DM2 (TT: $4,2 \pm 1,1$ ng/ml; $p = 0,004$ y TB: $1,47 \pm 0,5$ ng/ml; $p < 0,0001$), SM (TT: $4,1 \pm 1,2$ ng/ml; $p = 0,002$ y TB: $1,75 \pm 0,6$ ng/ml; $p = 0,04$) e IR (TT: $4,2 \pm 0,9$ ng/ml; $p = 0,004$ y TB: $1,76 \pm 0,5$ ng/ml; $p = 0,02$). Los pacientes con DM2 presentaron menores valores de TB: $1,47 \pm 0,5$ ng/ml vs pacientes con SM (TB: $1,75 \pm 0,6$ ng/ml; $p = 0,01$) e IR (TB: $1,76 \pm 0,5$ ng/ml; $p = 0,01$). Se halló una correlación negativa entre: TT y PC: $r: -0,39$, $p < 0,0001$; TT e IMC: $r: -0,40$, $p < 0,0001$; TB y edad: $r: -0,32$, $p < 0,0001$; TB y PC: $r: -0,39$, $p < 0,0001$; TB e IMC: $r: -0,29$, $p = 0,0001$. Los pacientes con DM2 con buen control metabólico (HbA1C $\leq 7\%$) ($n = 41$) presentaron mayores niveles de TB vs pacientes con HbA1C $> 7\%$ ($n = 26$): $1,56 \pm 0,5$ vs $1,31 \pm 0,4$ ng/ml ($p = 0,04$).

Conclusiones: Los pacientes con DM2 tienen menores niveles de TB y los valores de TB son mayores a mejor control metabólico. Los sujetos normales presentan mayores niveles de TT y TB al compararlos con pacientes con IR, SM y DM2. Los niveles de TT y TB correlacionan negativamente con IMC y PC.

FUNCIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISO GONADALEN HOMBRES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

P.R. Costanzo¹, S.M. Suárez¹, H.E. Scaglia^{2,3}, C. Zylbersztain²
y P. Knoblovits¹

¹Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear.
Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina. ²Laboratorio CEUSA-LAEH. ³Laboratorio de Determinaciones Hormonales.
Hospital Italiano de La Plata. Buenos Aires. Argentina.

Introducción: Los varones con diabetes tipo 2(DM2) tienen menores niveles de testosterona (T₀) y mayor prevalencia de hipogonadismo. No existen estudios que evalúen la función global del eje gonadal en pacientes con DM2.

Objetivos: Evaluar la función hipotálamo-hipófiso-testicular en pacientes con DM2. **Metodología:** Estudio transversal. Se incluyeron 14 pacientes con DM2 (grupo DM2) y 15 sujetos sin DM2 (grupo Control). Laboratorio basal: glucemia, LH, T₀ total (TT), T₀ biodisponible (TB), T₀ libre (TL), estradiol (E2), E2 biodisponible (E2B) y SHBG. Estudio de pulsatilidad: medición de LH plasmática cada 10 min por 4 hs, identificación y cálculo de frecuencia y amplitud de pulsos mediante software Pulsefit. Prueba de LHRH: LH basal, 30, 60 y 90

min luego de inyección e.v. de 100 ug LHRH. Prueba de HCG: TT, TB, TL, E2, E2B y SHBG basal y 72h luego de inyección i.m. de 5.000 UI HCG. Se calculó área bajo la curva (AUC) para las hormonas medidas en pruebas de LHRH y HCG.

Resultados: La glucemia fue mayor en el grupo DM2 y no hubo diferencias en edad, IMC, perímetro cintura y laboratorio basal entre grupos. Los pacientes del grupo DM2 tuvieron menor frecuencia de pulsos versus grupo Control: $0,8 \pm 0,8$ vs $1,5 \pm 0,5$ pulsos, ($p = 0,009$). Se observó una correlación negativa entre n de pulsos y glucemia: $r: -0,39$, ($p = 0,03$). No se hallaron diferencias en amplitud de los pulsos de LH, valores absolutos ni AUC de LH 30, 60 y 90 minutos post LHRH y en valores absolutos ni AUC de TT, TB, TL, E2, E2B y SHBG post HCG entre grupos.

Conclusiones: Los pacientes con DM2 tienen una menor frecuencia de pulsatilidad hipotalámica sin cambios en la respuesta hipofisaria al estímulo con LHRH ni en la respuesta testicular al estímulo con HCG. Los niveles de glucemia correlacionaron negativamente con el número de pulsos de LH, lo que sugiere un efecto negativo de la hiperglucemia en la secreción hipotalámica de LHRH.

DIAGNÓSTICO PREIMPLANTATORIO POR FUSIÓN CÉNTRICA REALIZADO CON METODOLOGÍA MOLECULAR

M.E. Ducatelli, G. Mondadori, J. Mincman y R. Coco

Laboratorio de Reprogenoma. Fecunditas-Medicina Reproductiva. Buenos Aires. Argentina.

Introducción: Las fusiones céntricas son reordenamientos equilibrados entre cromosomas acrocéntricos. Las más frecuentes son la t(13;14) y la t(14;21). El riesgo teórico para la producción de gametas desbalanceadas para los cromosomas involucrados es 75%, mientras que el riesgo empírico para nacidos afectados cae al 1%. Por su potencial efecto intercromosómico se asocia con otras aneuploidías y por rescate de trisomías a disomías uniparentales que cobran importancia en cromosomas imprimados.

Objetivos: Se presenta la realización de un PGD en un portador infértil que requería erradicar la fusión.

Metodología: Pareja joven que consulta por esterilidad primaria. Evaluación normal en la mujer, mientras que el varón evidenció una OAT con cariotipo 45,XY,t(13;21)(q10;q10) heredada de su madre. Estimulación ovárica con agonistas y gonadotrofinas recombinantes. Se obtuvieron 10 blastocistos, los cuales fueron biopsiados y vitrificados inmediatamente. El estudio se abordó por array CGH y QF-PCR. Para la QF-PCR se usó una mezcla de STRs informativos que permitieron identificar a los cromosomas 13 y 21 libres de los translocados. La transferencia se realizó en ciclo con endometrio preparado fisiológicamente. Embarazo positivo.

Resultados: De los 10 blastocistos estudiados, 6 resultaron normales (4 con los cromosomas 13 y 21 translados y 2 libres). De los 4 anormales (1 monosomía 13, 1 monosomía 16, 1 trisomía 3 y una triploidía XYY) todas fueron de origen materno, excepto la monosomía 13.

Conclusiones: El resultado benéfico de la fusión hallada concuerda con los previos reportados para las fusiones más comunes. De acuerdo con nuestro conocimiento es la primera vez que se describe la combinación de aCGH y QF-PCR para ganar eficacia diagnóstica, ya que el aCGH si bien detecta desbalances de todo el genoma, no permite distinguir los cromosomas libres de los balanceados, tampoco detecta ploidías ni origen de las aneuploidías. No se evidenció efecto intercromosómico ni disomías uniparentales.

EXPRESIÓN DE LA FAMILIA GÉNICA DAZ (DELETED IN AZOOSPERMIA) EN PATOLOGÍAS TESTICULARES HUMANAS

C.R. González¹, C. Álvarez Sedó², M.L. Muscarsel Isla¹, F. Nodar², S. Papier² y A.D. Vitullo¹

¹Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico. CEBBAD. Universidad Maimónides. Buenos Aires. Argentina. ²Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción. CEGYR. Buenos Aires. Argentina.

En un 10-15% de los casos de infertilidad masculina puede detectarse la incapacidad del hombre para producir un número suficiente de espermatozoides. Los patrones histológicos mayormente encontrados en estos pacientes son la hipoespermatogénesis (H), el arresto germinal (MA) y el síndrome de sólo células de sertoli (SCO). La familia génica DAZ consiste de tres miembros: dos genes autosómicos BOULE y DAZ-L (*DAZ-like*) y el gen DAZ en el cromosoma Y. Todos se expresan en la línea germinal y son esenciales para el desarrollo, maduración y diferenciación de las células germinales. Se ha propuesto que el factor regulador del ciclo celular *CDC25A*, el cual se expresa en el testículo, sería regulado por la familia DAZ. El objetivo de este trabajo fue estudiar en biopsias testiculares diagnosticadas con H y MA la expresión de BOULE, DAZ-L y DAZ y *CDC25A* por Real time PCR e inmunohistoquímica y su correlación con el éxito de recuperación de espermatozoides de estas biopsias para ser utilizados en técnicas de reproducción asistida. Por inmunohistoquímica se detectó DAZ en células germinales de biopsias con H y MA. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de BOULE, DAZ-L y DAZ y *CDC25A* entre patologías ($p > 0,05$). Sin embargo, se observaron correlaciones positivas entre los niveles de expresión para: DAZ / DAZ-L; DAZ/BOULE, DAZ-L / BOULE; DAZ-L / *CDC25A* y *CDC25A* / BOULE ($p < 0,05$). Por último, existieron diferencias significativas en los niveles génicos de BOULE y *CDC25A* en biopsias con éxito de recuperación de espermatozoides vs biopsias con ausencia de espermatozoides ($p < 0,05$). En conclusión, los niveles de expresión de los genes DAZ, BOULE, DAZ-L y *CDC25A* correlacionarían con el daño espermático observado en pacientes con H y MA y se destacan como posibles predictores moleculares de recuperación de espermatozoides mediante biopsia testicular.

CORRELACIÓN ENTRE ECOGRAFÍA Y RESONANCIA MAGNÉTICA EN PATOLOGÍA TESTICULAR BENIGNA Y MALIGNA

O. Layus¹, L. Uria¹, G. Gueglio¹, J. Ocantes², G. Rey Valzacchi¹ y O. Damia¹

¹Servicio de Urología; ²Servicio de Diagnóstico por Imágenes. Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

Introducción: La ecografía es por lo general la técnica de imagen inicial para la evaluación en la patología testicular. Sin embargo, cuando los datos que aporta la ecografía son inespecíficos o subóptimos, la resonancia magnética (RM) con gadolinio puede ser una herramienta útil para definir conductas. La RM permite diferenciar masas intra de extratesticulares, mejor diferenciación cuando es una masa sólida, una respuesta inflamatoria o anomalía vascular. Su utilización en casos seleccionados puede disminuir el número total de procedimientos quirúrgicos innecesarios y reducir el costo. El presente trabajo describe la correlación entre los hallazgos por ecografía y por RM con gadolinio en patología testicular.

Metodología: Se analiza la correlación entre los hallazgos de RM con gadolinio y ecografía en 34 pacientes que consultaron al Servicio de Urología del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Resultados: Se solicitó RM con gadolinio a 34 pacientes que tenían ecografía testicular previa. En 13 pacientes (38,23%) la ecografía describía lesiones benignas, siendo confirmadas mediante la RM. En 5 casos (14,7%) los datos ecográficos eran insuficientes e

inespecíficos y con la RM se definieron las lesiones como infarto testicular. El resto de los 16 pacientes (47%) tenían descripción de lesión tumoral por ecografía, de este subgrupo en 9 pacientes (56,25%) la RM describió estas lesiones como inflamatorias o atróficas, evitando así realizar biopsia testicular a estos pacientes. En los otros 7 (43,75%) la RM confirmó el diagnóstico ecográfico de lesión tumoral, reafirmando la necesidad de biopsia en estos casos. La biopsia en 4 de estos 7 pacientes fue positiva para tumor maligno y en uno para tumor de células de Leydig.

Conclusiones: La RM permitió evitar la biopsia en más de la mitad de los pacientes cuya descripción ecográfica era de lesión tumoral. Por otro lado reafirmó la necesidad de biopsia en 7 pacientes. La RM es una herramienta útil en casos seleccionados, cuando los datos ecográficos no son concluyentes, sin embargo la ecografía testicular continúa siendo el método diagnóstico principal en la patología gonadal.

MODIFICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO SEMINAL LUEGO DEL TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE EN VARONES INFÉRTILES

S.M. Suárez¹, P.R. Costanzo¹, G. Rey Valzacchi², O. Layus²,
O. Etchegoyen³, G. Turin³, L. Arévalo³, M. Jazán³ y P. Knoblovits¹

¹Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear;

²Servicio de Urología. Hospital Italiano de Buenos Aires.

Argentina. ³Laboratorio CEUSA-LAEH. Buenos Aires. Argentina.

Introducción: El estrés oxidativo es uno de los factores que contribuyen a la infertilidad masculina por daño en el ADN espermático, el tratamiento antioxidant podría mejorar este daño.

Objetivos: Evaluar parámetros seminales y fragmentación de ADN mediante test de TUNEL antes y después del tratamiento antioxidante en varones infértiles con test de TUNEL positivo.

Metodología: Estudio prospectivo de intervención con comparación intrasujeto del tipo "antes-después". Estadística: InStat Statistical Software (GraphPad, versión 3.01), test de t para muestras pareadas. Los datos se presentan como $X \pm DE$. Se consideró significativo $p < 0,05$. Criterios de inclusión: varones infértiles mayores de 18 años, con test de TUNEL positivo. Criterios de exclusión: enfermedad severa, uso de medicación que afecte la espermatogénesis, alcoholismo, tabaquismo, varicocele. Evaluación basal: medición de hormona luteinizante, folículo estimulante, estradiol, prolactina, testosterona total y biodisponible; espermograma, stress test modificado (MOST), TUNEL y evaluación de factor inmunológico. Luego se indicó tratamiento por 90 días con: vitamina E 1 g/día, vitamina C 1 g/día, L-carnitina 3,5 g/día y acetil-L-carnitina 1 g/día. Evaluación postratamiento: espermograma, MOST y TUNEL. Para disminuir el efecto de la variabilidad espermática se tomó un promedio de parámetros espermáticos, MOST y TUNEL en dos muestras con diferencia de 15 días en la evaluación basal y postratamiento.

Resultados: 12 pacientes de $38,0 \pm 3,6$ años de edad completaron el estudio. Se observaron diferencias significativas pretratamiento vs postratamiento en: TUNEL: $41,0 \pm 13,7\%$ vs $23,7 \pm 4,1\%$, $p = 0,0019$ y MOST: $0,31 \pm 0,25$ vs $0,50 \pm 0,29$, $p = 0,018$, respectivamente. En 11 pacientes (91,6%) hubo una disminución del TUNEL postratamiento. Se lograron 4 embarazos (5 nacidos vivos) postratamiento.

Conclusiones: El tratamiento antioxidant fue efectivo para disminuir el estrés oxidativo y el daño de ADN espermático medido por test de TUNEL en varones infértiles. La presencia de fragmentación de ADN espermático y el tratamiento de la misma debería evaluarse en parejas infértiles sin causa aparente.