

Revisiones

Utilidad del estudio del organizador nucleolar en la infertilidad masculina

Utility of the study of nucleolar organizer in male infertility

Dres. Adriana Rocher*, Melba Sardi*, Mercedes Pugliese*, Patricia Chenlo*, Herberto Repetto**, Julia Ariagno*, Susana Curi*, Luis Palaoro***, Gabriela Mendeluk***

*Especialista en Bioquímica Clínica, Área Citología

**Especialista en Bioquímica Clínica, Área Química Clínica

***Doctor en Bioquímica

Laboratorio de Citología y Fertilidad Masculina, Dpto. de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA, Córdoba 2351, 1° piso, CABA

E-mail: adrianarocher@yahoo.com.ar

Resumen

El nucléolo, considerado históricamente como el sitio único de síntesis de los ribosomas, representa actualmente una estructura dinámica que participa en importantes procesos celulares, principalmente como regulador del ciclo celular. Es el lugar de reserva de proteínas fundamentales que intervienen en la mitosis.

Las regiones organizadoras nucleolares (NOR) son segmentos de ADN que codifican el ARN ribosómico (ARNr), se encuentran asociadas íntimamente a un conjunto de nucleoproteínas ácidas específicas que pueden ser detectadas mediante técnicas de impregnación argéntica, que se denominan *regiones organizadoras nucleolares argirofílicas* (AgNOR). La cantidad de AgNOR en interfase está estrictamente relacionada con la rapidez de la proliferación celular y se ha asociado fundamentalmente a procesos neoplásicos.

Realizaremos una actualización del estudio del nucléolo en el tracto masculino como marcador de la espermatogénesis y su probable transferencia al laboratorio de fertilidad masculina.

Palabras clave: nucléolo, regiones organizadoras nucleolares, AgNOR, células germinales, espermatogénesis.

Abstract

The nucleolus has been considered historically as the unique synthesis site of ribosomes, currently represents a dynamic structure that participates in important cellular processes, mainly as a regulator of cell cycle. It is the place to reserve key proteins involved in mitosis. The nucleolar organizer regions (NOR) are segments of DNA encoding ribosomal RNA, are intimately associated to a specific set of acid nucleoproteins that can be detected by silver staining techniques, which are called argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs). The number of interphase AgNORs is strictly

related to the rate of cell proliferation and has been associated mainly to neoplastic processes. We will update the study of the nucleolus in the male tract as a marker of spermatogenesis and its possible transfer to the laboratory of male fertility.

Keywords: nucleolus, nucleolar organizer regions, AgNORs, germ cells, spermiogenesis.

Introducción

Estructura y función del nucléolo

El nucléolo fue descrito por Fontana hace más de 200 años como "un cuerpo ovoide visible en el núcleo". Con el advenimiento de la microscopía electrónica pudo conocerse su estructura y a través de la genómica y proteómica, se sigue estudiando su función.

Cuando la célula está en interfase, en mamíferos superiores, el nucléolo es un compartimiento subnuclear que está generalmente constituido por tres regiones reconocidas por microscopía electrónica de transmisión (1).

La primera región denominada **centro fibrilar** es la más interna. Está compuesta por finas fibrillas de ~50Å de diámetro y contiene cientos de genes en tándem que transcriben para ARNr. A estas zonas se las denomina *regiones del organizador nucleolar* (NOR). También se encuentran las proteínas: ARN-polimerasa I, ADN-topoisomerasa I y el factor de transcripción UBF (*upstream binding factor*).

Alrededor del centro fibrilar se encuentra el **componente fibrilar denso**, el cual se observa como una capa compacta compuesta principalmente por fibrilarina. Esta proteína está involucrada en la 2' o-metilación de ribosomas del ARNr y en los primeros estadios del procesamiento de los ARNr.

Toda la zona fibrilar está dentro de una región más grande, compuesta principalmente por gránulos de 15-20 nm de diámetro, y denominada **componente**

granular, la cual es la tercera región y la más externa que conforma el nucléolo, donde se realiza el ensamblaje de las partículas prerribosomales destinadas a ser transportadas al citoplasma. En el componente granular se concentran la fosfoproteína nucleolar B23 y NOP52, las cuales participan en los estadios intermedios y tardíos de la biogénesis de los ribosomas (2) (Figura 1).

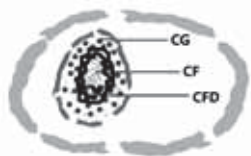


Figura 1. Estructura del nucléolo. CG: componente granular; CF: centro fibrilar; CFD: componente fibrilar denso.

Funciones del nucléolo

El nucléolo es una estructura dinámica del núcleo de la célula que regula importantes procesos, como la síntesis ribosomal.

Ha sido propuesto como el paradigma de la compartimentalización funcional nuclear (3). Esta estructura nucleolar es altamente dinámica. Mediante estudios de videomicroscopía confocal y por medición de la velocidad de recuperación de fluorescencia o de la pérdida de la señal fluorescente, se ha demostrado que las proteínas nucleolares encargadas de la transcripción (subunidades de la ARN polimerasa I y factores de transcripción), del procesamiento de los ARNr (como B23, NOP52, nucleolina y RPP29) y la fibrilarina se intercambian continuamente con el citoplasma y con otros compartimientos nucleares (4).

Sobre la base de los avances recientes en proteómica nucleolar y la dinámica de las proteínas nucleolares, algunos autores proponen que la estructura tripartita del nucléolo es aún más compleja, abarcando además otros componentes como cromatina condensada perinucleolar e intranucleolar, intersticios y vacuolas nucleolares (5).

Recientemente se observó que la nucleolina puede unirse a una zona de *untranslated regions* (UTR) del ARN mensajero (ARNm) que codifica la síntesis del p53, inhibiendo su síntesis si la célula no está dañada; caso contrario, otra proteína nucleolar, la RPL26, toma el lugar de la nucleolina induciendo la expresión de p53. De esta forma, la producción de esta proteína de un gen supresor parece ser controlada primariamente por proteínas de origen nucleolar (6).

También se ha demostrado que la proteína del retinoblastoma puede inhibir la síntesis de ARNr por la ARN polimerasa I, a través de la asociación con el factor de transcripción UBF. Se ha observado que durante la diferenciación celular hay una disminución de la actividad transcripcional del ADN ribosomal y una rápida acumulación de proteínas del retinoblastoma en el nucléolo (7). En síntesis, parecería que el nucléolo intervendría en el

mecanismo de acción de genes supresores que regulan el ciclo celular.

¿Qué son las AgNOR?

Las regiones organizadoras nucleolares (NOR) son segmentos de ADN que codifican al ARNr y fueron descritas por primera vez por Heitz y McClintock (8). Se localizan en las constricciones secundarias del brazo corto de los cromosomas 13,14, 15, 21 y 22 (9) en metafase de las células eucariotas. Estas regiones se encuentran asociadas íntimamente a un conjunto de nucleoproteínas ácidas específicas que pueden ser detectadas mediante técnicas de impregnación argéntica, que se denominan *regiones organizadoras nucleolares argirofílicas* (AgNOR).

Esta técnica fue llevada a cabo inicialmente por Howel y Black (1982) y por Ploton y cols. (1986) (10). Posteriormente, con técnicas electroforéticas, las proteínas han sido identificadas tanto en interfase (nucleolina y proteína B23) como en mitosis (subunidades de ARN polimerasa I y factor de transcripción UBF) (11).

La plata (Ag) se une selectivamente a estas proteínas; su cantidad y estado de fosforilación determinan la cantidad de tinción NOR, la cual se relaciona con la actividad proliferativa de una célula dada (12).

Las AgNOR se visualizan en forma de puntos localizados en el núcleo. El nucléolo de una célula con bajo nivel de biogénesis ribosomal se caracterizará con un punto único y grande, mientras que el nucléolo de células activas (como por ejemplo, linfocitos activados por fitohemoaglutinina) tendrá un gran número de pequeños puntos de AgNOR (13).

El área ocupada por estos puntos negros teñidos con plata dentro del nucléolo está relacionada con el área nucleolar total y con el nivel de síntesis de ribosomas (Derenzini) (5). Es evidente que en células proliferativas la cantidad de AgNOR se incrementará progresivamente en la fase G1 temprana, alcanzando un valor máximo en el fin de la fase S que permanecerá constante en la fase G2 (11).

La cantidad de AgNOR en interfase está estrictamente relacionada con la rapidez de la proliferación celular. Se ha reportado que en líneas celulares tumorales humanas in vitro, con tiempo de duplicación celular corto, había un alto número de AgNOR (14-16). Estos datos fueron confirmados in vivo en un estudio que relacionaba cantidad de AgNOR con tiempo de duplicación de masa tumoral de células cancerígenas humanas en xenoinjertos en ratones atómicos (17).

El tamaño nucleolar y la actividad de la ARN polimerasa I en líneas celulares neoplásicas humanas están en relación inversa al tiempo de duplicación de dichas células. Estos hechos apoyan la idea de la medición del área nucleolar como parámetro de proliferación celular (18).

Antecedentes

A partir de los primeros trabajos de Howell, en 1982, y de Ploton y cols., en 1986, diferentes grupos de investigación se interesaron en valorar las posibilidades diagnósticas y pronósticas de la determinación de regiones organizadoras nucleolares (NOR) en diversas neoplasias de los animales y del hombre.

La primera aplicación de este procedimiento de tinción con plata realizada por Ploton y cols. (19) para visualizar nucléolos de células cancerígenas de tumores humanos demostró que las células humanas con cáncer de próstata tenían un número mayor de AgNOR que las correspondientes benignas o hiperplásicas.

Después de este trabajo pionero, se estudiaron las características nucleolares de casi todos los tipos de cáncer humano y sus lesiones benignas con la idea de que el tamaño nucleolar diferente era suficiente para diferenciar una célula benigna de una neoplásica (20).

Se concluyó que sólo en pocos casos el tamaño nucleolar serviría para diferenciar entre células malignas y benignas, ya que existe una frecuente superposición de los resultados, lo que ha generado reportes de diverso tipo pero escasamente comparables entre sí. Para unificar resultados, el protocolo de la técnica debe estar estandarizado y deben establecerse normas procedimentales (21).

Estandarización del método

Existen diferencias en la técnica de impregnación y el procedimiento utilizado para cuantificar e interpretar las AgNOR (21). Dos métodos se han propuesto para el análisis cuantitativo de las AgNOR: el método de conteo y el método morfométrico. El primero consiste en la enumeración de cada punto impregnado por plata, lo que resulta difícil, ya que a veces éstos se superponen y además su tamaño es variable, particularmente en las células cancerosas (22). El método morfométrico requiere de instrumental costoso, pero preciso; mide el área ocupada por las estructuras impregnadas en plata y constituye la forma más objetiva de cuantificar las AgNOR, para comparar y reproducir (21).

En nuestro laboratorio se realizaron ambos métodos. El de conteo fue empleado para estudiar derrames de serosas, lo que permite diferenciarlos en malignos y reactivos. Más recientemente y contando con nuevas tecnologías de análisis de imágenes (Image Pro-plus), realizamos la morfometría de las AgNOR en lesiones de cuello uterino como marcador pronóstico de lesiones premalignas (23).

Trabajos recientes sobre AgNOR

Se propuso su utilización para diferenciar tumores prostáticos de patología benigna junto con otros

marcadores de proliferación (PCNA) y de estirpe tumoral (citoqueratina 34BE12) con resultados superiores al diagnóstico morfológico (hematoxilina-eosina) (24). Datos similares fueron reportados en casos de lesiones macroscópicas orales sospechosas de malignidad; la sensibilidad fue del 100% para las AgNOR, y fue del 91,17% para la coloración de Papanicolaou (25)

En cáncer de mama se halló alta correlación negativa entre los receptores para estrógenos y las AgNOR, lo que indica que este último sería un buen marcador pronóstico (26). Por otra parte, tanto por el método morfométrico como el de conteo, se pudo diferenciar carcinoma papilar de tiroides de lesiones tiroideas benignas en punciones con aguja fina (27).

Reportes de utilización de AgNOR en testículo

Hay escasos trabajos referidos a este tema, y todos están focalizados en el diagnóstico de malignidad. Así, Loftus y cols. (28) logran aumentar la sensibilidad del diagnóstico de neoplasia germinal intratubular testicular empleando fosfatasa alcalina placentaria y AgNOR (84% vs. 70% sólo con la técnica de hematoxilina-eosina). La media del número de puntos de AgNOR por núcleo para carcinoma in situ de testículo fue de 26,86 (19-52, SD: 2,58); fue de 8,18 (5-14, SD: 2,20) para las espermatogonias y de 12,96 (9-18, SD: 2,44) para las células de Sertoli, sin que se observara solapamiento entre los grupos (29). Los mismos resultados se reportaron al analizar las imágenes por morfometría (30).

Nuestra experiencia: reporte de un caso

Al estudiarse un eyaculado y realizarse el recuento diferencial de células no espermatozoides, se hace especial hincapié en diferenciar un cuadro infeccioso y/o inflamatorio de uno que denote fallas en la espermatogénesis. Si bien se habla en general de porcentaje de células germinales, la coloración de Papanicolaou permite diferenciar por criterio morfológico espermatozoides de espermátides. La detención de la espermatogénesis puede ocurrir a diferentes niveles, espermatogonia, espermatozoides o espermátide (31, 32). Las alteraciones en la espermatogénesis dependen de múltiples factores: exposición a altas temperaturas, factores nutricionales, agentes alquilantes, radiación, edad avanzada, patología genética, infecciones, alteraciones del eje gonadal o pueden ser de origen testicular (torsión testicular, hidrocele, criptorquidea, varicocele) (32). La degeneración del epitelio germinal puede deberse al consumo de drogas empleadas para diversas patologías aún no relacionadas con el tracto genital. La interacción molecular de las drogas con los constituyentes biológicos puede causar cambios citológicos profundos y tener efecto tóxico. La acumulación de drogas en los lisosomas puede generar cambios



SAEGRE

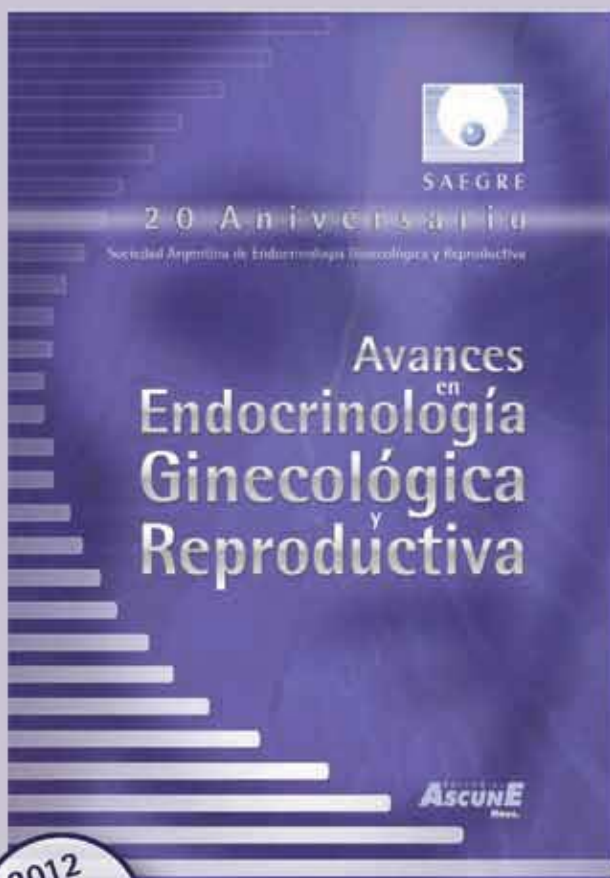
SAEGRE || Nueva Edición Actualizada

La publicación de la segunda edición refleja claramente la evolución del texto, donde experimentados autores –muchos de ellos nuevos en los capítulos pero internacionalmente reconocidos–, han desarrollado los importantes adelantos en las ciencias reproductivas y su impacto en la práctica clínica. A pesar de la complejidad de los procesos involucrados, los autores han procurado abordar los temas manteniendo el ordenamiento lógico de la fisiología. Los capítulos del libro no descuidan el papel del laboratorio y los avances tecnológicos disponibles que han permitido profundizar los conocimientos sobre la salud, disfunción y enfermedad del sistema reproductivo.

Precio lanzamiento || \$ 450

Gastos de envío por
Correo Argentino Certificado **\$ 30**

1168 páginas || 20 x 28 cm || Tapa dura



2012
NUEVA
EDICIÓN

EDITORIAL ASCUNE HNOS.

VENTA TELEFÓNICA CON TARJETA DE CRÉDITO, CHEQUE, TRANSFERENCIA
BANCARIA O GIRO POSTAL A NOMBRE DE HERNÁN DIEGO ASCUNE

Bulnes 1985, 2º 5 (1425), Buenos Aires, Argentina

Telefax: (54-11) 4823-3190 / 4829-9601

E-mail: info@editorialascune.com

www.editorialascune.com

EDITORIAL
ASCUNE
Hnos.

Qlaira®

La Nueva Píldora en Armonía con el cuerpo de la Mujer

- Qlaira® aporta Estradiol, estrógeno idéntico al que produce el organismo de la mujer y lo complementa con Dienogest¹
- Qlaira® garantiza el óptimo balance hormonal entre el ValE2 y Dienogest con su Régimen de Dosificación Dinámica¹

Referencia:

1. Jensen J, et al. Evaluation of a new estradiol oral contraceptive: estradiol valerate and dienogest. Expert Opin. Pharmacother. (2010), 11(7): 1147-57.



Bayer HealthCare

damsella

Drospirenona 3 mg
Etinilestradiol 0.02 mg

El anticonceptivo a su medida



- Alta efectividad anticonceptiva.
- Muy buen control de ciclo.
- Excelente perfil de seguridad.
- Niveles hormonales más estables con bajas dosis de estrógeno.
- Aprobado para el tratamiento del Síndrome Disfórico Premenstrual.
- Aprobado para el tratamiento del acné.

PRESENTACIÓN: Envases con 28 comprimidos recubiertos.
(24 comprimidos naranjas activos + 4 comprimidos blancos inertes)



Gador 
Al Cuidado de la Vida

<http://www.gador.com.ar>

DESIRÉ®

DIENOGEST 2 mg

Desear estar mejor

Nuevo

Tratamiento específico de la endometriosis

- Disminuye los síntomas de la endometriosis ⁽¹⁾ y el dolor pélvico asociado ⁽²⁾
- Mejora temprana de la signosintomatología asociada ⁽²⁾
- Eficaz en el tratamiento a largo plazo ⁽³⁻⁴⁾
- Reduce las lesiones endometriósicas ⁽¹⁾
- Actividad antiproliferativa ⁽⁵⁾, antiangiogénica ⁽⁶⁾ e inmunoreguladora ⁽⁵⁾
- Efectividad comparable a los GnRH, con un perfil de seguridad y tolerabilidad adecuados ⁽⁷⁾
- Cómoda posología: una toma diaria
- Costo de tratamiento más accesible



Calidad Gador

Presentación:

Envase calendario conteniendo 28 comprimidos recubiertos

1) Kohler G, Faustmann TA, Gerlinger C, Seitz C, Mueck AO. A dose-ranging study to determine the efficacy and safety of 1, 2, and 4mg of dienogest daily for endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2010; 108: 21-25. 2) Strowitzki T, Faustmann T, Gerlinger C, Seitz C. Dienogest in the treatment of endometriosis-associated pelvic pain: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 151: 193-198. 3) Petraglia F, Hornung D, Seitz C, et al. Reduced pelvic pain in women with endometriosis: efficacy of long-term dienogest treatment. *Arch Gynecol Obstet* (2012) 285:167-173. 4) Schindler AE. Dienogest in long-term treatment of endometriosis. *International Journal of Women's Health* 2011; 3: 175-184. 5) Katsuki Y, Takano Y, Futamura Y et al. Effects of dienogest, a synthetic steroid, on experimental endometriosis in rats. *European Journal of Endocrinology* 1998; 138: 216-226. 6) Nakamura M, Katsuki Y, Shibutani Y, Okawa T. Dienogest, a synthetic steroid, suppresses both embryonic and tumor-cell-induced angiogenesis. *Eur J Pharmacol* 1999; 386: 33-40. 7) Strowitzki T, Marr J, Gerlinger C, Faustmann T, Seitz C. Dienogest is as effective as leuprolide acetate in treating the painful symptoms of endometriosis: a 24-week, randomized, multicentre, open-label trial. *Hum Reprod* 2010; 25(3): 633-641.



Ginkan

Antimicrobiano y reepitelizante vaginal



Ginkan

OVULOS

Antimicrobiano y reepitelizante vaginal

PRESENTACION:
Envases con 6 y 12 óvulos vaginales.



Ginkan500

METRONIDAZOL

El metronidazol oral adecuado a cada esquema posológico. Complemento en el tratamiento de la pareja por vía oral.

PRESENTACION:
Envases con 8 y 20 comprimidos recubiertos.



Flucoginkan

FLUCONAZOL

Tratamiento de la candidiasis vaginal efectivo por vía oral.

PRESENTACION:
Envases con 1, 2 y 4 comprimidos ranurados.



Baliarda
Vida con salud
www.baliarda.com.ar

citológicos característicos que hablan de la etiología del daño (33).

Hasta el momento, sólo se emplea la biopsia testicular para evaluar la detención de la espermatogénesis. La detención en el proceso de diferenciación de las células germinales puede ser parcial o total, causando oligospermia o azoospermia respectivamente. De hecho esta condición puede ser transitoria o permanente. La citología espermática es un excelente marcador de funcionalidad del epitelio germinal (34) y una señal de alerta en casos de oligozoospermia que podría evolucionar a azoospermia (35). Su estudio podría optimizarse con el empleo de un marcador de proliferación como son las AgNOR, para lo cual describiremos un caso paradigmático.

Realizamos el seguimiento de un paciente del Programa de Inseminación Intrauterina del Hospital de Clínicas “José de San Martín”. El paciente consumía alprazolam y enalapril (20 mg/día). Nos sorprendió el hallazgo de un número bajo de espermatozoides acompañado de una alta celularidad (Tabla I), lo que habla de un trastorno de la espermatogénesis (36). Lo estudiamos en cinco oportunidades, en la segunda el cuadro se agravó y disminuyó el número de espermatozoides; la concentración de células germinales en el eyaculado (CG) superó el valor absoluto de espermatozoides hallados (S), lo que da un índice CG/S >1. Decidimos estudiar en dicha oportunidad las células germinales con técnicas suplementarias. Así empleamos la técnica de TUNEL para evidenciar fragmentación del ADN (37), eosina para detectar necrosis y AgNOR para evaluar proliferación (22). Paralelamente, realizamos la coloración de Papanicolaou y microscopía electrónica, correlacionando las observaciones morfológicas con las estructurales.

La Tabla II muestra los resultados hallados a los 15 días de iniciado el estudio. Mientras que la mitad de las células evidencian un estado apoptótico preneocrótico (el 46% de las células tenían su ADN fragmentado) (Figura 2), el 53% de ellas expresó el marcador de proliferación celular (Figura 3) y el resto mostró franca necrosis (Figura 4) (38).

Comenzó entonces el tratamiento del paciente con una forma comercial mezcla de vitaminas y antioxidantes (L-carnitina fumarato 1,725 g, fructosa 1 g, acetil-L-carnitina 500 mg, vitamina E 60 mg, ácido cítrico 50 mg y vitamina C 30 mg). El cuadro no revirtió; siguió agravándose, aumentando el índice CG/S y disminuyendo el marcador de proliferación que fue del 3% y del 2% a los tres y cuatro meses de iniciado el estudio, lo que refuerza el concepto de que el daño en la espermatogénesis estaba en progreso. Finalmente, el cuadro revirtió (CG/S: 0,5) cuando se le suministró al paciente citrato de clomifeno.

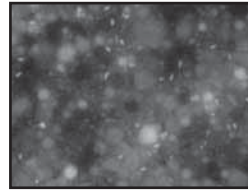


Figura 2. Ensayo de TUNEL en células germinales (400X).

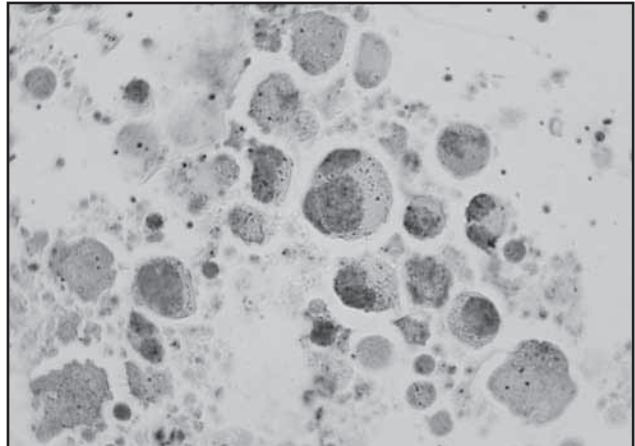


Figura 3. Coloración de AgNOR en células germinales (1000X).

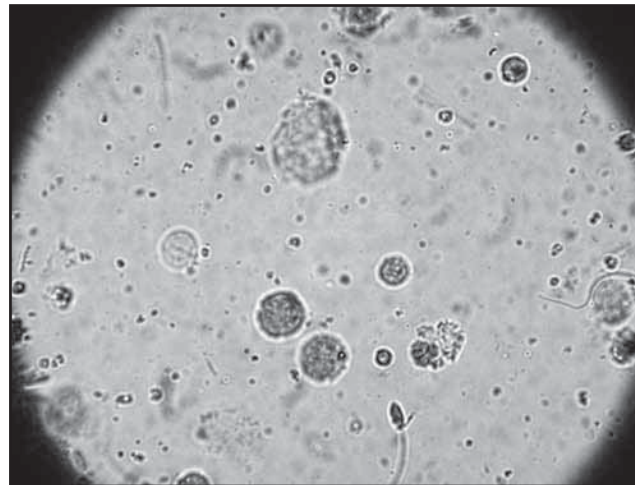


Figura 4. Test de vitalidad (eosina) (400X).

Discusión

Si bien el estudio de las AgNOR es empleado junto con otras determinaciones para aumentar la sensibilidad en el diagnóstico de malignidad, en realidad se trata de un marcador de proliferación celular.

Al realizar el seguimiento de un paciente que presentaba franca disminución del número de espermatozoides y alta celularidad, notamos que la AgNOR fue positiva en la mitad de las células germinales estudiadas, lo que indica actividad nucleolar, mientras que la otra mitad presentó signos de muerte evidenciada a través de la fragmentación

del ADN (TUNEL) y el test de vitalidad (eosina). El empeoramiento del cuadro citológico se correlacionó con la brusca disminución de la AgNOR. Se trata de una experiencia única y preliminar que dio lugar a la formulación de una hipótesis que debería ser probada poblacionalmente. Nuestra propuesta es que en el eyaculado, la disminución de células germinales que expresan las AgNOR orientarían al diagnóstico de falla en la espermatogénesis. Esta idea se basa en la observación por microscopía óptica y electrónica de cambios apoptóticos y degenerativos de las células de progenie. Estos cambios aumentan a medida que disminuye la expresión de las AgNOR, que se convertiría así en un marcador temprano de disminución de proliferación en casos de oligozoospermias que podrían evolucionar a azoospermia.

Tabla II. Estudios complementarios realizados en la muestra II.

| Técnica empleada | Células positivas |
|------------------|-------------------|
| Eosina | 51% |
| AgNOR | 53% |
| TUNEL | 46% |

Tabla I. Evolución del espermograma del paciente en el tiempo.

| Mta | Tpo. | Vol. (ml) | Cc Ez (mill/ml) | Cc CG (mill/ml) | Ez/eyac. (mill) | Cél./eyac. (mill) | CG (%) | C G eyac. (mill) | CG/Ez | Tratamiento |
|-----|------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|--------|------------------|-------|--------------------------------------|
| I | 0 | 6,5 | 8,75 | 4,40 | 56,9 | 28,60 | 93 | 26,6 | 0,5 | Ninguno |
| II | 15 d | 5,6 | 0,77 | 1,00 | 4,30 | 5,60 | 92 | 5,10 | 1,2 | Ninguno |
| III | 3 m | 3,7 | 0,55 | 1,45 | 1,85 | 5,40 | 90 | 4,90 | 2,6 | Antioxidantes |
| IV | 4 m | 4,4 | 0,99 | 2,80 | 4,35 | 12,30 | 92 | 11,30 | 2,6 | Antioxidantes |
| V | 7 m | 5,3 | 6,80 | 3,90 | 36,00 | 20,7 | 86 | 17,8 | 0,5 | Antioxidantes + citrato de clomifeno |

Cc Ez: concentración de espermatozoides; Cc CG: concentración de células germinales; Ez/eyac.: espermatozoides/eyaculado; Cél./eyac.: células/eyaculado; CG/eyac.: células germinales/eyaculado; CG/Ez: células germinales/espermatozoides.

Referencias

- Kierszenbaum A. Histología y biología celular. Introducción a la anatomía patológica, 2ª ed. Madrid: Elsevier 2008, pp. 1-56.
- Rosete M, Padros MR, Vindrola O. El nucléolo como un regulador del envejecimiento celular. Medicina. 2007;67:183-194.
- Strouboulis J, Wolffe AP. Functional compartmentalization of the nucleus. J Cell Sci. 1996;109:1991-2000.
- Misteli T. The concept of self-organization in cellular architecture. J Cell Biol. 2001;155:181-5.
- Derenzini M, Pasquinelli G, O'Donohue MF, Ploton D, Thiry M. Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. J Histochem Cytochem. 2006;54:131-45.
- Saxena A, Rorie CJ, Dimitrova D, Daniely Y, Borowiec JA. Nucleolin inhibits Hdm2 by multiple pathways leading to p53 stabilization. Oncogene. 2006;25:7274-7288.
- Comai L. The nucleolus: a paradigm for cell proliferation and aging. Braz J Med Biol Res. 1999;12:1473-8.
- McClintock B. The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea mays. Z Zellforsch Mikrok Anat. 1934;21:294.438.
- Howell WM. Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). En: Busch H, Rothblum L, eds. The Cell Nucleus. New York: Academic Press; 1982. pp. 89-143.
- Ploton D, Menager M, Jeansson P. Improvement in the staining and the visualization of the argiophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. Histochem J. 1986;18:5-14.
- Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdún D. The AgNOR protein: qualitative and quantitative changes during the cycle cell. Micron. 2000;31:121-126.
- Derenzini M, Pession A, Trerè D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. Lab Invest. 1990;63:137-140.
- Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. Int Rev Exp Pathol. 1991;32:150-192.
- Trerè D, Pession A, Derenzini M. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. Exp Cell Res. 1989;184:131-137.
- Derenzini M, Thiry M, Goessens G. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. J Histochem Cytochem. 1990;38:1237-1256.
- Derenzini M, Sirri V, Trerè D, Ochs R. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is

- related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab Invest* 1995;73:497-502.
17. Trerè D. Quantitative analysis of AgNOR proteins: a reliable marker of the rapidity of cell duplication and a significant prognostic parameter in tumour pathology. *Advances in Clinical Pathology*. 1998 Oct;2(4):261-270.
 18. Derenzin M, Trerè D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathology*. 2000 Jun;191(2):181-6.
 19. Ploton D, Menager M, Lechki C, Jeannesson P, Visseaux B, Adnet JJ. Silver staining of nucleolus organizer regions (NORs). Application to the study of nucleolar structure and value in pathology. *Ann Pathol*. 1988;8(3):248-52.
 20. Derenzin M, Trerè D. AgNOR proteins as a parameter of the rapidity of cell proliferation. *Zentralblatt Pathologie*. 1994 Mar;140(1):7-10.
 21. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron*. 2000 Apr;31(2):127-31.
 22. Rocher A, Blanco AM, Palaoro L. Utilidad de la técnica de AgNOR en la interpretación de los derrames de cavidades serosas. *Revista Médica de Chile*. 2000;128:963-968.
 23. Hidalgo J, Rocher A, López J, Gamboni M, Vighi S, Canessa O, Peressini S, Guerra F, di Carlo M, Palaoro L, Tatti S. AgNOR, p16 and human papillomavirus in low-grade squamous intra-epithelial lesions of the uterine cervix. Preliminary report. *Biotech Histochem*. 2012 May;87(4):257-264. Epub 2011 Dec 9.
 24. Manna AK, Pathak S, Gayen P, Sarkar DK, Kundu AK. Study of Immunohistochemistry in Prostatic Lesions with Special Reference to Proliferation and Invasiveness. *Indian J Surg*. 2011 Mar-Apr;73(2):101-106.
 25. Rajput DV, Tupkari JV. Early detection of oral cancer: PAP and AgNOR staining in brush biopsies. *JOMFP*. 2010 Jul;14(2):52-8.
 26. Ahmed HG, Al-Adhraei MA, Ashankyty IM. Association between AgNORs and Immunohistochemical, Expression of ER, PR, HER2/neu, and p53 in Breast Carcinoma. *Pathology Research International*. 2011;Article ID 237217.
 27. Eroz R, Cucer N, Karaca Z, Unluhizarci K, Ozturk F. The evaluation of argyrophilic nucleolar organizing region proteins in fine-needle aspiration samples of thyroid. *Endocrine Pathology*. 2011 Jun;22(2):74-8.
 28. Loftus BM, Gilmartin LG, Brien MJ, Carney DN, Dervan PA. Intratubular germ cell neoplasia of the testis: identification by placental alkaline phosphatase immunostaining and argyrophilic nucleolar organizer region quantification. *Human Pathology*. 1990 Sep;21(9):941-8.
 29. Bcller M, Lauke H, Hartmann M. The value of the AgNOR staining method in identifying carcinoma in situ testis. *Pathology, Research and Practice*. 1994 May;190(5):429-35.
 30. Meng FJ, Giwercman A, Shakkebaek NE. Investigation of carcinoma in situ cells of testis by quantification of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs). *Journal of Pathology*. 1996 Oct;180(2):206-13.
 31. Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod*. 1998;4:757-762.
 32. Málaga Correa YR, Ortiz Núñez DA, Hernández Marín I, Tovar JM, Ayala Ruíz A. Spermatogenesis arrest. *Ginecol Obstet Mex*. 2005;73:500-508.
 33. Van Bambeke F, Gerbaux C, Michot JM, d'Yvoire MB, Montenez JP, Tulkens PM. Lysosomal alterations induced in cultured rat fibroblasts by long-term exposure to low concentrations of azithromycin. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42:761-767.
 34. Ariagno J, Curi S, Mendeluk G, Grinspon D, Repetto H, Chenlo P, Pugliese N, Sardi M, Blanco AM. Shedding of immature germ cells. *Arch Androl*. 2002;48:127-131
 35. Sardi-Segovia L, Rocher A, Pugliese M, Chenlo P, Curi S, Ariagno J, Repetto H, Cohen M, Mendeluk G, Palaoro L. Prognostic value of the study of germ cells in the ejaculate. *Biotech Histochem*. 2011 Aug;86(4):232-41.
 36. Kierszenbaum A. Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive. *Mol Reprod Dev*. 2001;58:1-3.
 37. Gorczyca W, Traganaos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*. 1993;53:945-951.
 38. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathway of cell death: oncosis, apoptosis and necrosis. *Toxicologic Pathology*. 1997;25:82-88.