

Análisis crítico por expertos de trabajos seleccionados

Resumen del trabajo seleccionado para el análisis crítico

Óxido nítrico sintetasa y nitración en tirosina en la astenozoospermia: un estudio inmunológico

Nitric oxide synthase and tyrosine nitration in idiopathic asthenozoospermia: an immunohistochemical study

Eleonora Salvolini, Eddi Buldreghini, Guendalina Lucarini, Arianna Vignini, Roberto Di Primio y Giancarlo Balercia

Resumen

Objetivo: caracterizar el patrón de expresión de las isoformas constitutivas e inducible de la no sintetasa de espermatozoides aislados de donantes fértiles normozoospermicos y astenozoospermicos infértiles, mediante el uso de inmunocitoquímica. Además, evaluar la expresión de citrulina, un marcador de la actividad de la no sintetasa y de nitrotirosina, la que indica la formación de peroxinitrito, que podría afectar la funcionalidad espermatológica a través de su acción citotóxica.

Diseño: estudio prospectivo. Fuente de pacientes: centro académico de infertilidad masculina. Pacientes: 29 pacientes infértiles con astenozoospermia idiopática y 26 donantes fértiles normozoospermicos emparejados por edad. Intervención: se evaluaron parámetros espermatológicos

cos y se realizó inmunocitoquímica en espermatozoides aislados. Medidas realizadas: análisis seminal para determinar volumen, conteo espermático, motilidad y morfología. Expresión inmunocitoquímica de isoformas de no sintetasa, citrulina y nitrotirosina.

Resultados: la expresión de isoformas constitutivas de no sintetasa fue mayor en espermatozoides aislados de pacientes con astenozoospermia.

Conclusión: nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que una mayor actividad de no sintetasa y un exceso de nitración en residuos tirosina podrían afectar la funcionalidad de espermatozoides en la astenozoospermia idiopática.

Palabras clave: astenozoospermia, células espermáticas, no sintetasa, nitrotirosina, inmunocitoquímica.

Dra. Silvina Pérez Martínez

Investigadora Adjunta CONICET

La infertilidad afecta aproximadamente al 15% de las parejas en edad reproductiva y el factor masculino es importante en casi la mitad de estos casos. El papel del estrés oxidativo como una de las principales causas de infertilidad masculina ha sido bien establecido (Agarwal y cols., 2011). De hecho, las especies reactivas del oxígeno como el óxido nítrico (NO) pueden afectar todos los componentes celulares, incluyendo los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, las proteínas y los ácidos nucleicos (Kothari y cols., 2010; Baker y cols., 2004).

La astenozoospermia es una causa común de infertilidad masculina y, aunque en la mayoría de los casos su origen es desconocido, se la puede asociar con infecciones en el tracto reproductor, varicocele, autoanticuerpos y, a nivel celular, con alteraciones morfológicas de los flagelos (Afzelius y cols., 1979; Escalier, 1984; Chemes y cols., 1998; Mitchell y cols., 2006; Moretti y cols., 2008). La etiología de esta patología incluye una serie de defectos bioquímicos, estructurales y funcionales, entre ellos la sobreproducción de NO.

El NO es un radical libre que se produce por la oxidación de la L-arginina a L-citrulina por acción de tres isoformas de la NO sintasa (NOS): la neuronal nNOS, la endotelial eNOS y la inducible iNOS. El NO tiene un importante rol en la patofisiología espermática dado que sus concentraciones bajas favorecen el proceso de capacitación espermática, la reacción acrosomal y la unión a zona pelúcida (Herrero y cols., 2007; Zini y cols., 1995; Sengoku y cols., 1998). Sin embargo, las concentraciones elevadas de NO llevan a la formación de peroxinitritos, un poderoso agente oxidante, lo que conduce a la célula espermática a un estado de estrés oxidativo y de esta manera, a la alteración de su funcionalidad, como la motilidad (Weinberg y cols., 1995; Balercia y cols., 2004).

En este trabajo los autores evalúan, mediante la técnica de inmunohistoquímica, la expresión de las enzimas NOS, de la L-citrulina (como indicador de la actividad de NOS) y la de nitrotirosina (como indicador del daño celular por exceso de NO) en espermatozoides de pacientes normospermicos y astenozoospermicos idiopáticos.

Los resultados muestran que los espermatozoides provenientes de los pacientes astenozoospermicos poseen una sobreexpresión de la enzima iNOS y un incremento en la producción de citrulina, así como también una mayor proporción de células espermáticas con marcación para nitrotirosina, comparados con los normospermicos. Esto sugiere una mayor producción de NO, lo que podría tener efectos negativos sobre la estructura y función de las proteínas (Radi y cols., 2004), y traducirse en una disfunción espermática y en la disminución de la capacidad fecundante de los espermatozoides. Previamente, estos mismos autores reportaron una sobreproducción de NO en los espermatozoides de pacientes astenozoospermicos que se correlaciona negativamente con la motilidad. Por lo tanto, lo novedoso de este trabajo es el desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica para determinar in situ la producción de NO y la posibilidad de evaluar el daño celular por esta molécula.

La base molecular de la astenozoospermia aún es desconocida. Hasta el momento es escasa la información acerca del estudio de la expresión y función de posibles moléculas espermáticas que pueden correlacionarse con el fenotipo de los espermatozoides de pacientes astenozoospermicos. La búsqueda de moléculas marcadoras de esta patología, tanto para el diagnóstico como para la identificación de blancos terapéuticos, es un tema de constante estudio. En los últimos 5 años, mediante el desarrollo de la proteómica, varios grupos están investigando la sobreexpresión o subexpresión proteica como posibles blancos para el diagnóstico (Martínez-Heredia y cols., 2008). Sin embargo, hasta la fecha, no hay disponible una terapia realmente eficaz para la astenozoospermia, y estos pacientes deben recurrir a los tratamientos con las técnicas de reproducción asistida.

El trabajo del grupo de Balercia es interesante en cuanto al aporte para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para este tipo de patología que tiene gran implicancia en la fertilidad masculina. Además, la determinación de los niveles de las especies reactivas del oxígeno en el semen de pacientes antes de una fecundación in vitro (FIV) puede ser útil en la predicción del resultado de la FIV y en el asesoramiento a los pacientes seleccionados con el factor masculino o infertilidad idiopática.

Bibliografía consultada

- Afzelius BA, Eliasson R. Flagellar mutants in man: on the heterogeneity of the immotile-cilia syndrome. *J Ultrastruct Res.* 1979;69(1):43-52.
- Agarwal A, Allamaneni SS. Free radicals and male reproduction. *J Indian Med Assoc.* 2011;109(3):184-87.
- Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;216:47-54.

- Balercia G, Moretti S, Vignini A, Magagnini M, Mantero F, Boscaro M, Ricciardo-Lamonica G, Mazzanti L. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *J Androl.* 2004;25(2):245-9.
- Chemes HE, Olmedo SB, Carrere C, et al. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod.* 1998; 13(9):2521-6.
- Escalier D. The cytoplasmic matrix of the human spermatozoon: cross-filaments link the various cell components. *Biol Cell.* 1984;51(3):347-63.
- Herrero MB, Viggiano JM, Perez-Martinez S, Gimeno MF. Evidence that nitric oxide synthase is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 1997;9:433-9.
- Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Du Plessis SS. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol.* 2010;48:425-35.
- Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Balleasca JL, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod.* 2008;23(4):783-91.
- Mitchell V, Rives N, Albert M, et al. Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities. *Hum Reprod.* 2006;21(8):2065-74.
- Moretti E, Pascarelli NA, Federico MG, et al. Abnormal elongation of midpiece, absence of axoneme and outer dense fibers at principal piece level, supernumerary microtubules: a sperm defect of possible genetic origin? *Fertil Steril.* 2008;90(4):1201.e3-8.
- Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(12):4003-8.
- Sengoku K, Tamate K, Yoshida T, Takaoka Y, Miyamoto T, Ishikawa M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 1998;69:522-27.
- Weinberg JB, Doty E, Bavaventena J, Haney JF. Nitric oxide inhibition of sperm motility. *Fertil Steril.* 1995;64:408-13.
- Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. Low levels of nitric oxide promote sperm capacitation in vitro. *J Androl.* 1995;16:424-31.

Dr. Uriel Pragier*Endocrinólogo, Sexólogo clínico, Hospital Churruca*

Salvolini y cols., en esta ocasión, demuestran nuevamente el efecto deletéreo del estrés oxidativo sobre la fertilidad.

Sabemos que el NO, sustancia ampliamente distribuida en el organismo, es producido a partir de la arginina y da como resultado, además, la citrulina, por la NO sintetasa, de la que se conocen varias isoformas.

En los espermatozoides el NO se combina con el superóxido y se obtiene el peroxinitrito, que genera las nitrotirosinas por nitración de los residuos tirosina de diversas proteínas. Esta nitración dificultará su fosforilación y, con ello, las vías normales de señalización celular. El aumento del estrés oxidativo exacerbará este mecanismo.

Se analizan, en este trabajo, los espermatozoides de 29 astenozoospermicos idiopáticos infértiles y de 26 normozoospermicos fértiles y se determina, por inmunohistoquímica, la presencia y el grado de expresión de distintas isoformas de la NO sintetasa. La neuronal y la endotelial, isoformas constitutivas, se expresan predominantemente en espermatozoides normales y la inducible, en espermatozoides de astenozoospermicos.

Estos hallazgos concuerdan con evidencias previas que le dan un rol fisiológico a las isoformas constitutivas y patológico a la isoforma inducible al generar esta última mucha cantidad de NO (y, por ende, de nitración proteica).

En la misma línea encuentran mayores niveles de citrulina (signo de mayor producción de NO) y de nitrotirosina (evidencia de mayor nitración proteica) en

espermatozoides de astenozoospermicos.

Hay que tener presente que, no obstante lo anteriormente expuesto, el NO es un componente fundamental de la fisiología espermática (interviene en la capacitación, reacción acrosomal, etc.), lo mismo que un determinado nivel de estrés oxidativo. Esto queda evidenciado, en este trabajo, por la detección de NO sintetasa, citrulina y nitrotirosina en espermatozoides normales.

Los autores trabajan en la relación entre estas alteraciones y la astenozoospermia idiopática en pacientes infértiles. Probablemente en pacientes fértiles con astenozoospermia idiopática pueda observarse lo mismo, aunque lo que ocurre en el caso de pacientes normozoospermicos infértiles y/o teratozoospermicos idiopáticos, infértiles o no (por ejemplo, aquellos con aumento de la fragmentación de ADN, algo muy vinculado al aumento del estrés oxidativo), no necesariamente es extrapolable al caso de los pacientes estudiados.

También constituye un interrogante los potenciales efectos deletéreos de estos procesos sobre el desarrollo embrionario posterior.

La evidencia arrojada por estos autores podría ayudar a abrir nuevas estrategias terapéuticas en el futuro. La disminución de la nitración proteica podría, por ejemplo, beneficiar a aquel grupo de pacientes astenozoospermicos con probada disminución de la actividad Na/K ATPasa, de relacionarse esta disfunción con trastornos en la fosforilación secundarios a nitración proteica.