

Alteraciones de la madurez nuclear en espermatozoides de varones con antecedentes de criptorquidia*

R. Fernández Valadés¹, M.L. Hortas Nieto², J.A. Castilla³, M. López de la Torre Casares⁴, J.C. Valladares Mendias¹, M. Alaminos Mingorance¹, A. Ruiz Montes¹, F.J. Castejón Casado¹, C. Sánchez López-Tello¹

¹Servicio de Cirugía Pediátrica, Hospital Universitario «Virgen de las Nieves». ²Servicio de Laboratorio, Hospital de Marbella. ³Unidad de Reproducción, Hospital Universitario «Virgen de las Nieves». ⁴Sección de Endocrinología, Hospital Universitario «Virgen de las Nieves»

RESUMEN: La asociación de infertilidad y criptorquidia es un hecho aceptado. Casi siempre se ha atribuido a la oligozoospermia, asthenozoospermia o teratozoospermia que presentan los eyaculados de los varones con este antecedente. Hemos estudiado la madurez nuclear de los espermatozoides de un grupo de varones con antecedentes de criptorquidia y la hemos comparado con la de un grupo control. Los resultados de este estudio demuestran la deficiente transformación de las proteínas nucleares en protaminas en los varones con antecedentes de criptorquidia respecto al grupo control, permaneciendo en su estado inmaduro de histonas. En los espermatozoides del eyaculado de varones adultos con antecedentes de criptorquidia encontramos alteraciones de la madurez nuclear que pueden contribuir a la subfertilidad de los mismos.

PALABRAS CLAVE: Criptorquidia; Infertilidad; Madurez nuclear espermática.

ALTERATIONS OF NUCLEAR MATURITY IN SPERMATOZOIDS OF MALES WITH ANTECEDENTS OF CRYPTORCHIDISM

ABSTRACT: The association between infertility and cryptorchidism is an accepted fact, usually attributed to the oligozoosperm, asthenozoosperm or teratozoosperm presented in ejaculation products of males with this antecedent. The nuclear maturity in a sample of men with antecedents of cryptorchidism have been studied and these results have been compared to those of a control group. The results of this work show the deficient transformation of nuclear proteins to protamines in males with antecedents of cryptorchidism compared to the control group, due to the remaining of immature histones. Alterations of nuclear maturity able to contribute to the subfertility of these men were found in spermatozooids of adult males with antecedents of cryptorchidism.

KEY WORDS: Cryptorchidism; Infertility; Spermatozoal nuclear maturity.

INTRODUCCIÓN

En el proceso normal de madurez nuclear se produce la sustitución de las proteínas somáticas histonas por proteínas

básicas o protaminas para dar lugar a la condensación normal del núcleo.

El antecedente de criptorquidia uni o bilateral disminuye la fertilidad⁽¹⁻³⁾, lo que ha sido relacionado principalmente con anomalías del seminograma (concentración, motilidad, vitalidad y morfología). No obstante, se han descrito problemas de fertilidad masculina a pesar de una calidad seminal normal (referida a los parámetros anteriores). Algunas anomalías de la condensación nuclear pueden dar lugar a alteraciones de la capacidad fertilizante del espermatozoide. La falta de madurez nuclear del espermatozoide, en el tránsito epididimario, hace que las proteínas nucleares no pasen de histonas o protaminas, habiéndose demostrado que los espermatozoides capaces de fertilizar el óvulo son aquéllos en que este proceso se ha completado⁽⁴⁾.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se partió de dos grupos de estudio: uno formado por 38 adultos con antecedentes de criptorquidia tratada en la infancia (se excluyeron los pacientes portadores de algún síndrome congénito o genético, o que presentaran alteraciones mentales) y 42 adultos voluntarios donantes de semen de la Unidad de Reproducción Asistida de nuestro Hospital. Los pacientes criptorquídicos habían sido avisados mediante carta para un estudio seminal al cumplir la mayoría de edad ($19,98 \pm 1,70$).

Del grupo estudio se escogieron aquellos eyaculados en los que, mediante Swim-up, se seleccionaron al menos 2×10^6 espermatozoides/ml, ya que es la concentración mínima de células necesaria para la realización de estas pruebas, que se realizaron en 10 voluntarios donantes de semen.

En el estudio del grado de madurez nuclear se siguió el método de la tinción con azul de anilina, de acuerdo con Dadoune⁽⁵⁾. Tras licuefacción y homogeneizado de la muestra de semen, se realizaba una extensión en un portaobjetos previamente desengrasado. Una vez seca la extensión a temperatura ambiente y fijada la misma en alcohol de 96° durante 20-30 minutos, se realizaba una tinción con la solución de

Correspondencia: Ricardo Fernández Valadés, C/ Abedul, 14 B. Urb. Los Cerezos, 4ª Fase, 18150 Gójar (Granada).

*Presentado en el XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica. Santander, 24 al 27 de mayo del 2000.

Tabla I Alteraciones seminales (OMS) en el grupo de adultos con antecedentes de criptorquidia según el tipo de afectación

Parámetro	Control (n = 42)	Criptorquidia unilateral (n = 27)	Criptorquidia bilateral (n = 11)	Criptorquidia uni y bilateral (n = 38)
Oligozoospermias (% del total)	0 (0%)	4 ^c (14,81%)	11 ^{a, d} (100%)	15 ^a (39,47%)
Astenozoospermias (% del total)	3 (7,14%)	9 ^e (33,33%)	5 ^e (45,45%)	14 ^e (36,84%)
Teratozoospermias (% del total)	12 (28,57%)	17 ^e (62,96%)	6 (54,55%)	23 ^e (60,53%)
Azoospermias (% del total)	0 (0%)	1 (3,70%)	4 (36,36%)	5 ^c (13,15%)
Normozoospermias (% del total)	29 (69,05%)	7 ^a (25,93%)	0 ^{a, b} (0%)	7 ^a (18,42%)

^ap < 0,001 vs grupo control; ^bp = 0,07 vs unilateral, casi significativo; ^cp < 0,05 vs grupo control; ^dp < 0,001 vs unilateral; ^ep < 0,01 vs grupo control.

azul de anilina al 3% en PBS durante 1 minuto. Se lavaba y se dejaba secar una hora como mínimo a temperatura ambiente. Para conservarla se introducía en xilol durante 3 minutos y se realizaba un montaje en DPX.

Los patrones observados fueron:

- **Negativo.** Corresponde a una cromatina espermática madura (protaminas). Aunque se observa la membrana celular teñida, el núcleo no aparece teñido. El acrosoma se puede observar tanto teñido como no teñido.
- **Intermedio.** Corresponde a una cromatina espermática ligeramente inmadura. Se observa el núcleo teñido ligeramente de azul y la banda ecuatorial aparece teñida de azul intenso.
- **Positivo.** Patrón correspondiente a gametos con cromatina espermática inmadura (histonas). El núcleo aparece teñido de azul intenso, así como la membrana e incluso el acrosoma.

El resultado final es expresado en porcentaje de gametos maduros (no teñidos) para la condensación de cromatina.

Para el estudio estadístico se utilizó el test de Mann-Whitney para comparar dos muestras independientes.

RESULTADOS

Las alteraciones del seminograma básico de ambos grupos lo podemos ver en la tabla I.

El grado de madurez nuclear fue referido al porcentaje de espermatozoides que no se tiñen con azul de anilina. Fue estudiado en el eyaculado de varones con antecedentes de criptorquidia y comparado con los resultados obtenidos en el grupo control de voluntarios donantes de semen. Dicho grado de madurez era menor, de forma estadísticamente signifi-

Tabla II Grado de madurez nuclear (% de espermatozoides no teñidos con azul de anilina) en el grupo de adultos con antecedentes de criptorquidia

	Control (n = 10)	AAC (n = 8)
% no teñidos	72 ± 6,4	39 ± 6,8 ^a

^ap < 0,01 vs grupo control

cativa, en el grupo de estudio. Los datos de la tabla II corresponden a la media del porcentaje de gametos no teñidos entre las distintas muestras.

DISCUSIÓN

A lo largo de la espermatogénesis se produce un cambio de histonas somáticas por proteínas básicas, protaminas, permitiendo la condensación nuclear normal⁽⁶⁾. Durante el tránsito epididimario se forman enlaces que aseguran la condensación estable de las nucleoproteínas⁽⁷⁾. Anomalías de la madurez nuclear han sido implicadas en la esterilidad masculina⁽⁸⁻¹⁰⁾. Dado el menor grado de madurez nuclear de los gametos, encontrado en nuestro estudio, en los varones con antecedentes de criptorquidia frente a voluntarios donantes de semen, podemos afirmar que estos pacientes tienen una alteración importante de la misma que puede contribuir a la posible esterilidad. Esta última no ha podido ser constatada en nuestros pacientes por su edad todavía temprana. Nuestros resultados confirman los publicados por Foresta y cols.^(6, 9, 11), en cuanto a que el antecedente de criptorquidia conlleva alteraciones de la cromatina nuclear que puede condicionar la

esterilidad de los mismos aún en presencia de normozoospermia. Estas alteraciones concuerdan con la presencia de alteraciones de la distribución y contenido del ADN publicadas por Muller y Skakkebaek⁽¹²⁾ que encuentran asimismo sólo disminución en el número de espermatogonias en los pacientes criptorquídicos.

Ya que parte de la maduración espermática se produce durante el tránsito epididimario⁽¹³⁾, es posible que las alteraciones morfo-estructurales del epidídimo que acompañan con frecuencia a la criptorquidia⁽¹⁴⁻¹⁷⁾ sean las responsables de esta alteración de la madurez nuclear.

Así pues, además de las alteraciones que muestran los varones con antecedentes de criptorquidia en el seminograma clásico, hemos de tener en cuenta otras alteraciones funcionales, a nivel del espermatozoide, como una causa añadida que contribuya a la esterilidad de los mismos, ya que la madurez nuclear se encuentra alterada de forma importante en los espermatozoides de estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cortes D, Thorup J, Linderberg S. Fertility potential after unilateral orchiopexy. *J Urol* 1996;**155**:1061-1065.
2. Carizac, Antiba A, Palazzi J, Pistono C, Morana F, Alarcón M. Testicular maldescendent and infertility. *Andrologia* 1990;**22**:285-288.
3. Grasso M, Buonaguidi A, Lania C, Bergamaschi F, Castelli M, Rigatti. Post-puberal cryptorchidism: review and evaluation of the fertility. *Eur Urol* 1991;**20**:126-128.
4. Yi Liu D, Baker HWG. Test of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1992;**58**:465-483.
5. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 1988;**20**:211-217.
6. Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992;**15**:330-337.
7. Bedford JM, Calvin HI, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil* 1973;**18**:199-213.
8. Colleu D, Lescoat D, Boujard D, Le Lannou D. Human spermatozoal nuclear maturity in normozoospermia and asthenozoospermia. *Arch Androl* 1988;**21**:155-162.
9. Foresta C, De Carlo E, Mioni R, Zorzi M. Sperm nuclear chromatin heterogeneity in infertile subjects. *Andrologia* 1989;**21**:384-390.
10. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 1996;**66**:634-639.
11. Foresta C, Indino M, Mioni R, Scanelli G, Scandellari C. Evidence of sperm nuclear chromatin heterogeneity in ex-cryptorchid subjects. *Andrologia* 1987;**19**:148-152.
12. Müller J, Skakkebaek NE. Abnormal germ cells in maldescended testes: a study of cell density, nuclear size and deoxyribonucleic acid content in testicular biopsies from 50 boys. *J Urol* 1984;**131**:730-733.
13. Kosower NS, Katayose H, Yannagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 1992;**13**:342-348.
14. Koff WJ, Scaletsky R. Malformations of the epididymis in undescended testes. *J Urol* 1990;**143**:340-343.
15. Herzog B, Rösslein R, Hadziselimovic F. The role of the processus vaginalis in cryptorchidism. Does a patent processus vaginalis have a prognostic importance for predicting subsequent fertility. *Eur J Pediatr* 1993;**152**(S2):S15-S16.
16. De Palma L, Carter D, Weiss RM. Epididymal and vas deferens immaturity in cryptorchidism. *J Urol* 1988;**140**:1194-1196.
17. Marshall FF, Shermeta DW. Epididymal abnormalities associated with undescended testis. *J Urol* 1979;**121**:341-345.