



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES.
IZTACALA.

PROTECCION *IN VITRO* DEL ADN DE
ESPERMATOZOIDES DE BORREGO POR
POLIAMINAS EN CONDICIONES DE
HIPERGLICEMIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.
(BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN).

P R E S E N T A:

Q.F.B. JOSE LUIS SAUER RAMIREZ.

Director de Tesis: Dr. José Domingo Méndez Francisco.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Director:

Dr. José Domingo Méndez Francisco.

Revisores:

Dr. Rafael Villalobos Molina

Dra. Emma Bertha Gutiérrez Cirlos Madrid

Dra. Margarita Díaz Flores

Dr. Martin Palomar Morales

GRACIAS:

A Dios..... por sobre todas las cosas.

A mis padres, Armando Sauer Palacios y Florencia Ramírez Gómez.... en paz descansan,..... por la vida.

A mi Esposa Maria Patricia Andrade Fernández por su apoyo incondicional.

A mis Hijos (as) Mariana, Karen y José Alejandro por ser estímulo para seguir adelante.

Al Dr. José Domingo Méndez Francisco por su confianza y apoyo.

A mis revisores: Rafael Villalobos Molina, Dra. Emma Bertha Gutiérrez Cirlos Madrid, Dra. Margarita Díaz Flores, Dr. Martín Palomar Morales por su tiempo y atinados comentarios.

A la Dra. Sandra A. Orozco Suárez, Dra. Ma. Aguilera Riestra, Rocío Torres Ávila por su apoyo en los momentos más difíciles que pase en investigación.

A mis compañeros de laboratorio: Dra. Iris Feria Romero, Dra. Patricia Campos Bedolla, Dra. Hermelinda Salgado Ceballos, Dr. Misael González Ramírez, M. en C. David Escalante, M en C Elisa Vences García, M en C Nayeli Flores, Bióloga

Vinnitsa Buzoianu, Patricia Quintanar, Manuel Treto.

ÍNDICE.

RESUMEN.	6
1. INTRODUCCIÓN.	8
2. GENERALIDADES.	9
2.1 Características generales del aparato reproductor masculino.	9
2.2 El epidídimo.	11
2.2.1 Estructura.	12
2.2.2 Función.	12
3. MARCO TEORICO.	13
3.1 Epidemiología de la infertilidad.	14
3.2 Infertilidad masculina.	14
3.3 Infertilidad y diabetes mellitus.	15
3.4 Fragmentación del DNA espermático.	16
3.5 Alteraciones del DNA inducidas por el estrés oxidativo.	17
3.5.1 Implicaciones de las mutaciones en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.	18
3.5.2 Relación de las mutaciones en el DNA mitocondrial con el estrés oxidativo.	19
3.5.3 Relación de las mutaciones en el DNA nuclear con el estrés oxidativo.	22
3.5.4 Estrategias antioxidantes para preservar el material genético.	23
3.5.5 Mecanismos de prevención del ataque oxidante.	23
3.5.6 Mecanismos antioxidantes nucleares.	25
3.5.7 Mecanismos de reparación.	25
3.6 Métodos de detección de fragmentación del DNA espermático.	27
3.7 Indicaciones clínicas.	28
3.8 Fragmentación del DNA en pacientes con diabetes mellitus.	28
3.9 Importancia del estudio de la fragmentación y protección del DNA.	29
3.10 Las poliaminas.	30
3.11 Fisiología de las poliaminas en el sistema reproductor masculino.	32
3.11.1. Testículos.	32
3.11.2 Próstata	33
3.11.3. Semen.	33

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	
35	
5. HIPÓTESIS.	36
6. OBJETIVO.	37
7. MATERIAL Y MÉTODOS.	38
7.1 Material biológico.	38
7.2 Procedimiento experimental de extracción del DNA.	41
7.3 Método de extracción.	41
7.4 Procedimiento experimental gel de agarosa.	42
7.5 Evaluación del DNA.	42
7.6 Condiciones experimentales.	42
8. RESULTADOS.	45
8.1 Integridad del DNA recién aislado por electroforesis en gel de agarosa.	45
8.2. Integridad del DNA recién aislado obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo por electroforesis en gel de agarosa incubado con glucosa 5.5 mM y 30 mM.	45
8.3. Integridad del DNA recién aislado obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo por electroforesis en gel de agarosa incubado con las poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM.	46
8.4. Integridad del DNA recién aislado obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo por electroforesis en gel de agarosa incubado con glucosa 5.5 mM y con las poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM.	46
8.5. Integridad del DNA recién aislado obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo incubado con glucosa 30 mM y con las poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM.	47
8.6. Aspectos comparativos de la electroforesis del DNA obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo con glucosa 5.5 mM y 30 mM.	47
8.7. Aspectos comparativos de la electroforesis del DNA obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo en presencia de poliaminas.	48

8.8. Aspectos comparativos de la electroforesis del DNA obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo en presencia de glucosa 5.5 mM y poliaminas.	
48	
8.9. Aspectos comparativos de la electroforesis del DNA obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo en presencia de glucosa 30 mM y poliaminas.	49
8.10. Aspectos comparativos de la electroforesis del DNA obtenido de espermatozoides de cola del epidídimo incubado con glucosa 5.5 mM y 30 mM y poliaminas por 180 días.	49
ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA.	50
8.11. Espectros de absorción a 260 nm del DNA obtenido de espermatozoides de diferente región del epidídimo recién aislado en condiciones basales y experimentales.	56
8.12. Cambios observados en los patrones de absorción del DNA en las dos condiciones experimentales estudiadas.	67
8.13. Efecto de la glucosa sobre la absorción del DNA a 260 nm.	67
8.14. Efecto de las poliaminas espermina, espermidina y putrescina sobre la absorción del DNA a 260 nm.	68
8.15. Efecto de la glucosa 5.5 mM y de las poliaminas sobre la absorción del DNA a 260 nm.	69
8.16. Efecto de la glucosa 30 mM y de las poliaminas sobre la absorción del DNA a 260 nm.	70
9. DISCUSIÓN.	72
10. CONCLUSIONES.	78
11. BIBLIOGRAFÍA.	79
12. ANEXO.	91
12.1 Electroforesis.	91
12.2 Electroforesis de DNA en gel de agarosa	91
12.3 Migración de los fragmentos de DNA en gel de agarosa	92
12.4 Reactivos	93

12.5 Material de laboratorio	94
12.6 Equipo de laboratorio.	94

RESUMEN.

La diabetes es una enfermedad común en el mundo, actualmente 246 millones de gente tienen diabetes y se calcula que este número aumentará a más de 300 millones en el año 2025. El sistema reproductivo no escapa a las complicaciones de esta enfermedad. La disfunción sexual es un factor predominante la cual incluye una falla o disminución de la libido, alteraciones en el coito y eyaculación retrógrada. Las características de la molécula de DNA del espermatozoide determinan la capacidad reproductora del varón, por lo que la fertilidad del hombre puede verse disminuida cuando el DNA se fragmenta. A pesar de que hay información relacionada con el efecto de la glucosa sobre el DNA, no hay reportes relacionados con el efecto de la hiperglucemia sobre el DNA en el proceso de maduración espermática.

Este trabajo fue diseñado para estudiar *in vitro*, el efecto de las poliaminas espermina, espermidina y putrescina (10 mM), sobre el DNA espermático en condiciones de hiperglucemia. Para esto, el DNA de espermatozoides obtenidos de la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo de borrego fue aislado y purificado, posteriormente fue incubado a 35°C, durante 30 ó 180 días en presencia de glucosa fisiológica de 5.5 mM y una de 30 mM simulando una condición de hiperglucemia. El efecto de las poliaminas fue estudiado por electroforesis en gel de agarosa y por espectroscopia ultravioleta (UV).

En las condiciones de este estudio la fragmentación fue parcialmente inhibida por las poliaminas, particularmente por la espermina y la espermidina, en menor grado por la putrescina, siendo la espermina la que mostró el mejor efecto protector del DNA, pero sin lograr evitar totalmente la fragmentación. El efecto protector puede estar relacionado con sus propiedades policatiónicas al contener un mayor número de grupos amino. Esta observación puede explicar, parcialmente, los requerimientos tan elevados de poliaminas en el semen, particularmente de espermina cuyas concentraciones se reportan de 5 a 15 mM en el semen humano.

Finalmente, consideramos que los resultados de este estudio contribuyen al entendimiento del papel que las poliaminas espermina, espermidina y putrescina juegan en la fisiología reproductiva en condiciones normales y cómo estas pequeñas moléculas pueden contribuir a prevenir el daño al DNA espermático en condiciones de hiperglucemia.

ABSTRACT.

Diabetes is a common disease in the world, 246 million people currently have diabetes and this number is estimated to increase to over 300 million in 2025. Long term complications include sexual dysfunction. Sexual dysfunction is a predominant factor which includes a failure or decreased libido, impaired sexual intercourse and retrograde ejaculation. On the other hand, even though the effect of hyperglycemia on the DNA structure is known, the effect of polyamines on spermatid DNA and hyperglycemia remain unknown.

This study was designed to evaluate the *in vitro* effect of the polyamines spermine, spermidine and putrescine (10 mM) on sperm DNA in hyperglycemic conditions. For this, the DNA was isolated and purified from sperm cells obtained from the head, body and tail of ram epididymis. Then DNA was incubated at 35 ° C for 30 or 180 days in the presence of 5.5 mM or 30 mM glucose simulating hyperglycemic condition. The effect of polyamines was analyzed by agarose gel electrophoresis and ultraviolet spectroscopy (UV).

Under the conditions of this study, the fragmentation was partially inhibited by polyamines, particularly spermine and spermidine, to a lesser extent by putrescine. Spermine showed the best protective effect on DNA. The protective effect may be related to properties of polycation to contain a greater number of amino groups. This observation may partly explain such high requirements of polyamines in the semen, particularly spermine whose concentrations are reported from 5 to 15 mM in human semen.

In conclusion, this study contribute to understanding the role that polyamines spermine, spermidine and putrescine play in the reproductive physiology in normal conditions and how these small molecules can help prevent sperm DNA damage in hyperglycemic conditions.

1. INTRODUCCIÓN.

La diabetes mellitus es una enfermedad común en el mundo, actualmente 246 millones de gente a nivel mundial tienen diabetes mellitus y se calcula que este número aumentará a más de 300 millones en el año 2025 [1]. Esta enfermedad se caracteriza por resistencia a la insulina, causada por una defectuosa secreción de insulina inducida por la glucosa, contribuyendo a un desajuste en la acción de insulina, que contribuye a un deterioro progresivo en la función de los islotes de Langerhans, que posteriormente se extiende a varios órganos y tejidos. El orden en que los efectos se manifiestan son: primero en el ojo, después en el riñón y finalmente en la circulación de miembros inferiores.

El sistema reproductivo no escapa a las complicaciones de la diabetes mellitus. Varias anomalías reproductivas se asocian a esta patología, tanto en el hombre como en la mujer [2]. Las alteraciones sexuales más importantes observadas en el hombre como consecuencia de la diabetes mellitus son: Daño del epitelio germinal, daño de los conductos seminíferos, adelgazamiento de la membrana basal, hiperplasia del tejido intersticial, calcificación de los conductos deferentes y disminución de la síntesis de andrógenos y gonadotropinas. La disfunción sexual es un factor predominante en la diabetes mellitus, la cual incluye una falla o disminución de la libido, alteraciones en el coito y eyaculación retrógrada. Las características de la molécula de DNA del espermatozoide determinan la capacidad reproductora del varón, por lo que la fertilidad del hombre puede verse disminuida cuando el DNA se fragmenta [3, 4] .

2. GENERALIDADES.

2.1 Características generales del aparato reproductor masculino

El desarrollo de los espermatozoides tiene lugar en el epitelio de los tubos seminíferos del testículo. Cada espermatozoide tarda aproximadamente 64 días en alcanzar su desarrollo a partir de una célula madre, en un proceso caracterizado por tres divisiones mitóticas y por lo menos de dos divisiones meióticas. Las células menos diferenciadas de la familia espermatogénica son las espermatogonias, se trata de células diploides, es decir, con dos ejemplares de cada cromosoma y están situadas cerca de la base del túbulo seminífero. Antes de llegar a la fase de espermatoцитos primarios, se dividen activamente mediante mitosis. Los espermatoцитos experimentan dos meiosis sucesivas, al final de las cuales, los espermatoцитos secundarios dan origen a dos espermátides redondas, células haploides, que al igual que los espermatozoides tienen cromosomas en un solo ejemplar. Esta reducción del material genético es necesaria para que, en la fecundación, el genoma del hombre y el de la mujer se unan y formen el genoma del futuro embrión [5].

Los cambios que a continuación presenta la espermátide redonda para convertirse en espermatozoide parecen tener como objetivo esencial el dotar al gameto masculino de la capacidad necesaria para llegar al óvulo, penetrar en sus capas protectoras y fusionarse con él. La célula se afina, hace aparecer un eje antero-posterior (espermátide «alargada») y se desarrolla un flagelo, una especie de hélice que le servirá para sus desplazamientos. Se forma también una vesícula secretora llamada acrosoma (Figura 1), que contiene enzimas hidrolíticas, las cuales utilizará para penetrar las capas celulares y acelulares que rodean el óvulo en el momento de la fecundación. Finalmente, tienen lugar modificaciones importantes en la composición de las proteínas del núcleo [6, 7]. Los ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNAs), que transcriben los mensajes del DNA para realizar todos estos cambios, son sintetizados en abundancia hasta la fase de espermátide redonda, pero no después.

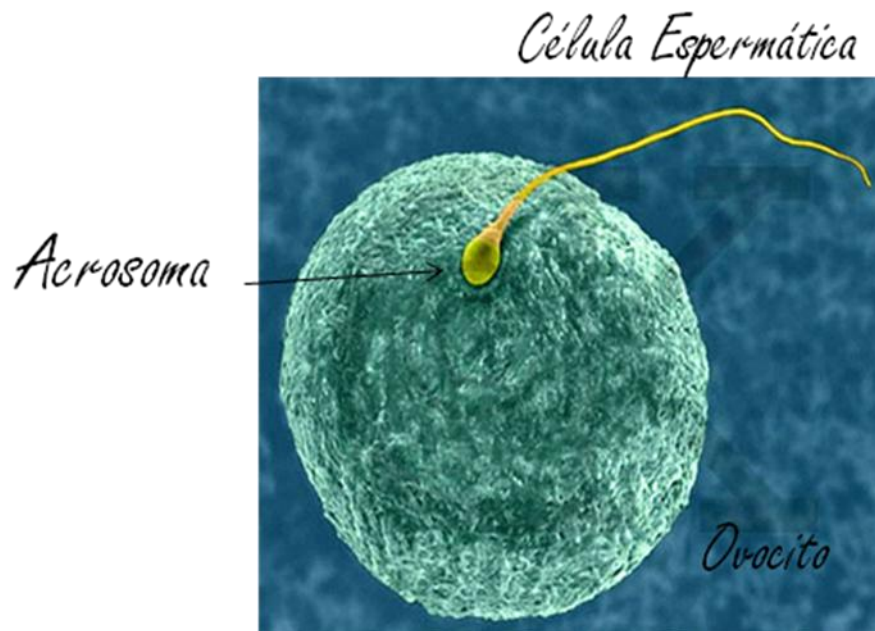


Figura 1. Espermatozoide unido a la zona pelúcida de un ovocito.

Algunas especies de mRNA solamente se traducen en proteínas durante el desarrollo de las espermatídes alargadas, cuando la transcripción ya se ha detenido. Ocorre que, aun cuando el proceso de espermatogénesis queda perturbado hasta el punto de provocar azoospermia, hay espermatozoides que se desarrollan en el testículo, de donde pueden tomarse fácilmente mediante biopsia. De ahí que, en estos últimos años, se haya desarrollado la técnica llamada ICSI (inyección intracitoplásmica de espermatozoides) [8].

Estudios recientes demuestran que en ausencia de espermatozoides, las espermatídas a veces son recuperables en su fase redonda o alargada a partir de biopsias testiculares, o incluso en ciertos pacientes a partir del eyaculado y que estas espermatídas pueda fecundar el óvulo humano.

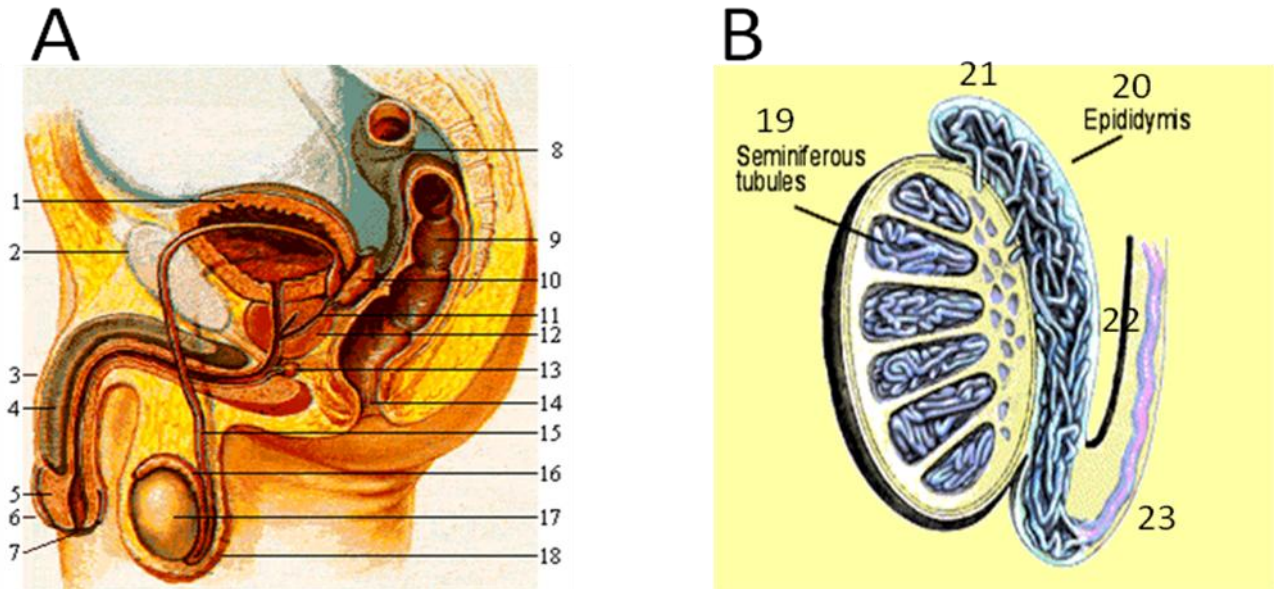


Figura 2. Partes que integran el sistema reproductor masculino:

- A.** 1. Vejiga urinaria, 2. Hueso púbico, 3. Pene, 4. Cuerpo cavernoso, 5. Glande, 6. Prepucio, 7. Abertura de la uretra, 8. Colon sigmoides, 9. Recto, 10. Vesícula seminal, 11. Conducto eyaculador, 12. Próstata, 13. Glándula de Cowper, 14. Ano, 15. Vaso deferente, 16. Epidídimo, 17. Testículo y 18. Escroto.
- B.** Corte transversal del testículo, 19. Túbulos seminíferos, 20. Epidídimo, 21. Cabeza, 22. Cuerpo y 23. Cola.

2.2 El Epidídimo.

El epidídimo es un tubo estrecho y alargado, situado en la parte posterior superior del testículo; conecta los conductos deferentes al reverso de cada testículo. Está constituido por la reunión y apilotonamiento de los conductos seminíferos. Anatómicamente se diferencia en *cabeza*, *cuerpo* y *cola* que continúa con el conducto deferente en la especie humana. Tiene aproximadamente 5 cm de longitud por 12 mm de ancho. Está presente en todos los mamíferos machos y desempeña un papel importante en la maduración de los espermatozoides, en particular su adquisición progresiva de la motilidad y capacidad fecundante [9].

2.2.1 Estructura.

Si el epidídimo fuera estirado alcanzaría unos 6 metros. Los conductos del epidídimo están revestidos con epitelio cilíndrico pseudoestratificado y recubiertos por una capa de músculo liso. Las superficies libres de las células cilíndricas contienen microvellosidades y ramificaciones que se llaman estereocilios.

2.2.2 Funcionalidad.

Desde el punto de vista funcional, los conductos del epidídimo son el sitio de maduración de los espermatozoides, los cuales requieren entre 10 a 14 días para terminar su maduración, para ser capaces de fertilizar un óvulo. Además, es el sitio de almacenamiento de los espermatozoides y de reabsorción de los que no son eyaculados.

Los conductos del epidídimo, también almacenan espermatozoides y los expulsan hacia la uretra durante la eyaculación mediante contracciones peristálticas de su músculo liso. Los espermatozoides pueden permanecer almacenados en los conductos del epidídimo por más de cuatro semanas. Después de ese tiempo, se expulsan fuera del epidídimo o se reabsorben.

3. MARCO TEÓRICO.

Los espermatozoides son células altamente especializadas cuya función es la transferencia de la información genética de una generación a otra. Por lo tanto, la información transmitida debe cumplir con todos los requisitos necesarios para asegurar que la descendencia sea normal y mantenga las características biológicas de la especie. La fragmentación de la molécula del DNA es crítico para la producción normal de nuevos organismos [10].

En estudios desarrollados recientemente por diversos investigadores, se ha revelado que las características del DNA del espermatozoide determinan la capacidad reproductora del varón. También, se ha demostrado que la fertilidad del hombre puede verse disminuida cuando se fragmenta el DNA. La esterilidad en el varón está establecida por una serie de parámetros, como son: Número de espermatozoides, viabilidad, movilidad, etc. Sin embargo, se estima que solo el 15 por ciento de los hombres estériles presentan un espermograma normal [11-13].

Para determinar la esterilidad masculina no se puede considerar como valor diagnóstico un sólo parámetro de manera aislada. La fragmentación del DNA ha demostrado ser una de las principales causas de infertilidad en el varón y es uno de los principales argumentos para que el clínico decida si una pareja debe someterse a la técnica de Fecundación *in vitro* (FIV) o la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) y así lograr una gestación exitosa [14, 15].

De hecho, existen observaciones muy consistentes que consideran que el análisis rutinario del DNA del espermatozoide del varón, evitaría un sinnúmero de tratamientos fallidos de FIV, puesto que, tan sólo conociendo el estado de fragmentación del DNA se podría emplear, como primera opción, la técnica de ICSI. De este modo, se podrían reducir el tiempo y los costos para la pareja.

Es trascendente la manipulación de la muestra de semen en el laboratorio sobre el resultado del proceso de reproducción asistida. Cuando se procesa una muestra de semen, los espermatozoides se ven sometidos a una situación de estrés que se puede traducir en la ruptura del DNA. Así, se ha comprobado que el tiempo que transcurre entre la recolección de la muestra y la inseminación debe ser mínimo, porque cuanto más tiempo pase, más probabilidad existe que se produzca una ruptura del DNA, reduciéndose así las posibilidades de fecundación.

Es interesante resaltar que, al igual de que existen varones con un mayor o menor índice de fragmentación en su DNA, también se encuentran diferencias en la resistencia que el DNA presenta para ser degradado en el tiempo de manipulación. Esto indica, que existen muestras seminales procedentes de determinados varones que fragmentan su DNA de forma mucho más rápida que el DNA procedente de otros, por lo que, es otra característica a tomar en cuenta en el momento de entender la capacidad que tiene el varón para lograr un mayor éxito reproductivo [16].

3.1. Epidemiología de la Infertilidad.

Una de cada cuatro parejas tiene problemas de fertilidad, 30 % de los casos se debe a causas femeninas, 30 % a causas masculinas, 30 % a un factor mixto y 10 % a factores desconocidos. El 30% de los casos masculinos son de origen desconocido [17].

Los exámenes de semen que se hacen se limitan a: espermograma, espermocultivo, detección de anticuerpos antiespermáticos, hasta que recientemente se desarrolló un nuevo examen para medir otra característica del semen que antes no era estudiada: La Fragmentación del DNA [18-22].

3.2. Infertilidad masculina.

Las causas de infertilidad masculina se han asociado a:

1. Azoospermia (ausencia de espermatozoides en el semen del varón).
2. Oligozoospermia (pocos espermatozoides).
3. Astenozoospermia (baja movilidad de los espermatozoides).
4. Teratozoospermia (alto porcentaje de espermatozoides alterados).

En algunos casos, incluso, puede que el varón no sea capaz de eyacular (aspermia) o que se produzca una eyaculación retrógrada, la cual consiste en que el semen con los espermatozoides “refluye” hacia la vejiga, no existiendo eyaculación tras el orgasmo.

Otros factores importantes son la presencia de anticuerpos antiesperma o infecciones. También cabe la posibilidad de que tanto el número, así como la

movilidad y la morfología de los espermatozoides sean normales, pero éstos no sean capaces de fecundar al ovocito por motivos que muchas veces se desconocen.

La casuística que afecta a la esterilidad es extensa y cada día los modelos de hábitos sociales parece que incrementan la probabilidad de verse afectado por un episodio de esterilidad. Por lo tanto, el disponer de nuevas formas para entender el problema nos acerca día a día a saber algo más de una realidad parcialmente oculta.

3.3. Infertilidad y diabetes mellitus.

A primera vista, los espermatozoides de un varón diabético parecen normales. Sin embargo, llama la atención una ligera disminución en el volumen del semen. Un análisis más detallado ha revelado daños en el material genético de los gametos. Mallidis sugirió que el aumento de la infertilidad masculina podría estar relacionada con la creciente tasa de diabetes ya que esta tiene un efecto negativo sobre la fertilidad masculina [23, 24].

El objetivo del trabajo de este grupo fue obtener el RNA que contienen los espermatozoides, moléculas esenciales en varios procesos biológicos, entre ellos, la reparación del DNA. Comprobaron como algunos transcritos del RNA estaban alterados, muchos de los cuales están implicados en la reparación de los daños del DNA de los espermatozoides. Por lo que, estas observaciones indicaron que los diabéticos tienen una reducción significativa de la capacidad de reparación del DNA, ya que una vez dañado no se puede reparar de forma eficiente.

Los daños en el material genético espermático se traducen en fracaso de la concepción, además, de un aumento en el riesgo de alteraciones en la descendencia. Hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto que daña el DNA.

En la diabetes se altera el desarrollo y la maduración del esperma. Los resultados son interesantes porque a pesar de que los espermatozoides parecen normales resultan ser muy diferentes a los de un hombre sano.

Los efectos nocivos de la diabetes no se quedan ahí, previamente en un ensayo este mismo grupo observaron que en el tracto reproductor de los varones diabéticos había unas moléculas, que aparecen típicamente en personas de edad avanzada, las cuales se acumulan con el paso del tiempo. El depósito de estos azúcares complejos, los productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs), depende del estilo de vida y

están asociados en muchas de las complicaciones diabéticas; además, están implicados de forma determinante en el deterioro del DNA [23, 24].

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que aumenta a escala mundial. Con el ritmo de crecimiento actual, se calcula que para el 2025 unos 300 millones de personas serán diabéticas [25], el doble que en 1995, coincidiendo con este ascenso, la infertilidad masculina también se ha disparado en los últimos años.

3.4. Fragmentación del DNA espermático.

La fragmentación del DNA espermático, tal y como lo indica su nombre, se refiere a rupturas o lesiones del material genético del espermatozoide. A mayor número de lesiones, menor será la integridad del material genético y menor la probabilidad de que se produzca un embarazo a término.

En algunos casos, el ovocito puede reparar el daño del DNA del espermatozoide que lo ha fecundado. Esto va a depender de varios factores: El tipo de lesión del DNA, el porcentaje de DNA del espermatozoide afectado y la calidad del ovocito. Este parámetro está generalmente ligado a la edad de la paciente.

Los niveles de fragmentación del DNA pueden diferir de una muestra a otra, dependiendo del tiempo de semanas de obtención. Las causas que provocan que se dañe el DNA del espermatozoide son varias y pueden ser de tipo intrínseco o inducido por factores externos.

Los factores intrínsecos incluyen:

-Selección ineficiente: La producción de espermatozoides se localiza en los túbulos seminíferos (testículos), en algunos casos, los espermatozoides y sus células progenitoras sufren alteraciones de tipo genético que resultan en rupturas del DNA. Estos espermatozoides dañados son generalmente seleccionados y eliminados, pero si el mecanismo de selección falla, aparecen espermatozoides en el eyaculado con el DNA fragmentado.

-Maduración incorrecta: Los espermatozoides sufren un proceso de maduración en el epidídimo que se conoce como maduración epididimaria. Este proceso de maduración conlleva al empaquetamiento de la cromatina nuclear y a la adquisición

de la motilidad espermática. Si este proceso no se lleva a cabo correctamente se pueden producir lesiones en el DNA espermático.

Los factores externos incluyen:

1. Daño inducido por radio / quimioterapia.
2. Varicocele.
3. Episodio de fiebre alta.
4. Enfermedad inflamatoria aguda y crónica.
5. El estrés oxidativo post-testicular.

3.5. Alteraciones del DNA inducidas por el estrés oxidativo.

El DNA puede ser alterado por acción de diversos agentes fisicoquímicos de origen extracelular, como las radiaciones ultravioletas o de origen intracelular como los radicales libres de oxígeno. Estos son especies químicas altamente reactivas, de vida media corta y producidas durante los procesos redox celulares [26].

En determinadas situaciones de estrés oxidativo o desequilibrio entre la prooxidación y la antioxidación, su producción excesiva puede lesionar irreversiblemente moléculas como el DNA y estructuras como la membrana plasmática, claves para el mantenimiento de la función celular, llegando incluso a producir la muerte de la propia célula [27].

En lo que se refiere al estrés oxidativo, se han descrito alteraciones moleculares, mutaciones en el DNA, alteraciones estructurales en cromosomas y núcleo, y una mayor sensibilidad a determinados fármacos: Bleomicina, mitomicina o adriamicina.

Así, en las patologías en las que se observa una activación de los leucocitos polimorfonucleares, se ha observado mayor nivel de rupturas espontáneas en las cromátidas y pérdidas de fragmentos cromosómicos, tales como en la anemia de

Fanconi, Síndrome de Bloom, esclerodermia, cáncer, hipertensión arterial, infecciones virales, envejecimiento, deficiencias nutricionales en antioxidantes (ácido fólico, ácido ascórbico o tocoferoles) [28-32], llegando incluso a la pérdida total de determinados cromosomas, como el X en ciertos casos de envejecimiento en mujeres [33].

Esta pérdida de secuencias en los cromosomas esta relacionada con duplicaciones incompletas durante la replicación del DNA [28, 34], debido quizás a pérdidas en la actividad DNA polimerasa u otras actividades enzimáticas todavía por identificar. Sin embargo, en otros casos de estrés oxidativo el material genético presenta muy escasas rupturas cromosómicas pero, por el contrario, es mucho más sensible a determinados agentes que inducen la ruptura de las cromátidas, como la bleomicina, tal y como se ha observado en linfocitos humanos durante procesos de envejecimiento [35].

En procesos neoplásicos se observa un incremento de intercambios defectuosos entre cromátidas hermanas en comparación con células normales. Estos procesos estarían relacionados con errores en la maquinaria de reparación del DNA [36]. Por otro lado, la presencia de cromosomas que no han sido incorporados al núcleo, después de la división celular suele presentarse con cierta frecuencia en determinados procesos relacionados con el estrés oxidativo, tales como cáncer y envejecimiento [37-39].

Este proceso puede inducirse también por mitomicina, un fármaco que inhibe la síntesis del DNA y que se utiliza como agente antitumoral. Utilizando este fármaco, se ha podido observar que células sometidas a determinadas situaciones prooxidantes son mucho más sensibles a la mitomicina, por lo que se debe tener extrema precaución con el uso de esta sustancia en terapias anticancerosas.

3.5.1. Implicaciones de las mutaciones en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Un modelo general para explicar alteraciones tisulares inducidas por estrés oxidativo podría ser a través de un proceso de cascada de amplificación. En este modelo se propone que los radicales libres de oxígeno, procedentes de diversas fuentes intra o extracelulares, atacarían en un primer tiempo a los lípidos de membranas y proteínas celulares. Estas macromoléculas oxidadas se convertirían a su vez en nuevas fuentes de radicales libres de oxígeno, lo que produciría un incremento incontrolado de las oxidaciones intracelulares. En estas circunstancias, los sistemas de defensa antioxidante se volverían ineficaces y la célula terminaría por morir. Las proteasas y

oxidasas intracelulares de la célula muerta serían liberadas al exterior afectando a células adyacentes y propagando, por lo tanto, la lesión oxidativa por todo el tejido [40].

Este modelo podría explicar las alteraciones observadas en patologías relacionadas con el estrés oxidativo tales como degeneración tisular, artritis o procesos inflamatorios [41]. Por otro lado, otras patologías en relación con el estrés oxidativo, tales como cáncer o envejecimiento, podrían explicarse considerando las mutaciones, debidas a alteraciones oxidativas del DNA, como la causa primaria, más que las alteraciones en los lípidos o las proteínas. En otras palabras, mutaciones en el DNA podrían afectar a proteínas clave en una determinada función celular. Por ejemplo, si alteraciones en el DNA afectan a genes que codifican protooncogenes, antioncogenes o proteínas reparadoras del DNA, se podría producir una transformación celular y favorecer el desarrollo de determinados estados cancerosos [42]. Esto podría explicar también el incremento de neoplasias en determinadas patologías, tales como diabetes, hipertensión arterial, obesidad, alcoholismo y tabaquismo.

En otros casos, se podría producir la muerte celular, si la proteína afectada catalizara una reacción importante en la célula como, por ejemplo, control del estado redox celular o defensa antioxidante. A causa de estas proteínas erróneas, la célula perdería con el tiempo su efectividad en el control de su estado redox, se vería privada poco a poco de sus defensas antioxidantes, las alteraciones oxidativas de los componentes intracelulares aumentarían y la célula terminaría por morir, liberando sus enzimas hidrolíticas y afectando a células del resto del tejido de una manera similar a la expuesta anteriormente [43, 44].

Hoy día se conocen patologías que se deben a formas mutadas de oxidasas, de proteínas involucradas en la defensa antioxidante o de proteínas que participan en cadenas de transporte de electrones. Estas patologías podrían clasificarse en 2 grupos en relación con el tipo de DNA que se ve afectado, es decir, el DNA mitocondrial o bien en el DNA nuclear.

3.5.2. Relación de las mutaciones en el DNA mitocondrial con el estrés oxidativo.

El DNA mitocondrial, por sus características particulares, merece una consideración aparte. Aunque existen varias copias del DNA mitocondrial por orgánulo, éste representa tan sólo el 1% del DNA total presente en la célula [45]. El DNA mitocondrial es circular a diferencia del DNA nuclear que es lineal. En el

hombre tiene una longitud de 16,569 pares de bases y codifica 13 subunidades proteínicas de diferentes complejos de la cadena respiratoria y 22 RNAs de transferencia y 2 RNAs ribosomales que intervienen en la síntesis de proteínas mitocondriales [46]. Sin embargo, a pesar de sintetizar sus propios RNA de transferencia y ribosomales, la replicación, transcripción y síntesis proteica en la mitocondria están controladas en su mayoría por factores codificados por el DNA nuclear [47]. Hay que señalar que es el único DNA heredado por vía materna [48] .

Como ya se ha propuesto anteriormente, mutaciones generadas por radicales libres de oxígeno en el DNA pueden afectar a genes que codifiquen proteínas implicadas en procesos redox celulares. En este sentido el DNA mitocondrial encajaría perfectamente en este planteamiento. Por su situación en la mitocondria, una de las más importantes fuentes generadoras de radicales libres de oxígeno *in vivo*, el DNA mitocondrial presenta una mayor tasa de fragmentación y mutaciones por modificaciones oxidativas de sus bases [49]. De esta forma, la presencia de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina es 16 veces superior a la del DNA nuclear [50].

Aunque cuantitativamente minoritario, el DNA mitocondrial contiene información fundamental puesto que codifica proteínas esenciales de la cadena respiratoria; subunidades de la NADH deshidrogenasa, de la citocromo oxidasa y el citocromo b y de la ATP sintasa [51, 52].

Por lo expuesto anteriormente, la probabilidad de sintetizar proteínas mutadas es mucho mayor en las mitocondrias que en el núcleo. Esto podría dar lugar a alteraciones en el funcionamiento de la cadena respiratoria, que incrementarían en la producción de radicales libres de oxígeno. Éstos oxidarían diferentes moléculas mitocondriales produciendo alteraciones profundas en el funcionamiento de este orgánulo, disminuyendo la producción de ATP (depleción energética) y favoreciendo la entrada de Ca^{2+} al interior de la matriz mitocondrial [53, 54]

La pérdida progresiva de la función mitocondrial afectaría gravemente la función celular y podría finalizar en la muerte celular por estrés oxidativo [28]. Esta hipótesis se ve reforzada, además, por otras particularidades inherentes a la misma mitocondria y que podrían incrementar todavía más la susceptibilidad oxidativa del DNA mitocondrial. Así, cabría destacar que la vida media del DNA mitocondrial es 10 veces más corta que la del DNA nuclear (100 días en hígado de rata) [55]. Esto hace que el DNA mitocondrial esté sometido a ciclos de replicación más a menudo que el

DNA nuclear, lo que conlleva una mayor probabilidad de introducción de errores, apoyado en el hecho de que la DNA polimerasa-g mitocondrial presenta una tasa de error de una base cada 7,000 (1/7,000), mientras que la de las polimerasas nucleares es de una base errónea cada 109 (1/109) [56].

Además de las maquinarias de replicación, transcripción y síntesis proteicas comparadas con sus homólogos nucleares y citosólicos, favorecen la introducción de errores adicionales. Por otro lado, el DNA mitocondrial está más expuesto a ataques químicos (de tipo oxidativo o no oxidativo), ya que no está protegido por las histonas, no está empaquetado de una forma compacta y no posee sistemas de reparación tan efectivos como los nucleares [57, 58]. Todos estos hechos hacen al DNA mitocondrial entre 10 y 20 veces más vulnerable que el DNA nuclear [59].

Por lo expuesto anteriormente, se podría suponer que situaciones en las que se lesione severamente el DNA mitocondrial y, por lo tanto, la función mitocondrial, podrían llegar a producir patologías relacionadas con el estrés oxidativo. En este sentido, determinadas miopías, enfermedades degenerativas, enfermedades hereditarias por vía materna, enfermedades metabólicas, procesos isquémicos y de envejecimiento suelen presentar diversas alteraciones en el DNA mitocondrial, tales como deleciones, inserciones, duplicaciones y mutaciones [60].

La disfunción mitocondrial está implicada en el proceso multifactorial de envejecimiento. En el envejecimiento humano aumentan los niveles de mutaciones somáticas del mtDNA que tienden a experimentar expansión clonal y causar deficiencia de mosaico de la cadena respiratoria en diversos tejidos, como corazón, cerebro, músculo esquelético e intestino. Existe una fuerte evidencia observacional y experimental para implicar mutaciones somáticas del mtDNA y la disfunción del mosaico de la cadena respiratoria en el proceso de envejecimiento de los mamíferos. La hipótesis de que las mutaciones somáticas del mtDNA son generados por el daño oxidativo no se ha demostrado concluyentemente. Los datos emergentes sugieren que en lugar de la tasa de error inherente de mitocondrial DNA (ADNmt) de la polimerasa gamma (gamma Pol) pueden ser responsables de la mayoría de las mutaciones somáticas del mtDNA [60].

La evolución biológica ha encontrado una solución de compromiso de forma que, aunque la mitocondria sea una fuente generadora de radicales libres de oxígeno, el genoma nuclear no puede prescindir de ella, así como la mitocondria no puede prescindir del núcleo. La replicación y la expresión del DNA mitocondrial dependen de proteínas codificadas por el DNA nuclear, pero a su vez el núcleo y la célula en

general se benefician del ATP producido por la mitocondria. En resumen, el DNA nuclear y el mitocondrial, son interdependientes y la estabilidad de ambos depende el buen funcionamiento de la célula.

3.5.3. Relación de las mutaciones en el DNA nuclear con el estrés oxidativo.

Mutaciones producidas por diversos agentes, relacionados o no con el estrés oxidativo, podrían afectar a genes nucleares que codifiquen proteínas involucradas en reacciones redox intracelulares. Es bien sabido que las células sometidas a situaciones de estrés oxidativo presentan un porcentaje de mutaciones superiores a las células control no sometidas al estrés. Así, por ejemplo, en el envejecimiento o en el consumo de tabaco, los individuos afectados presentan una tasa de mutación superior a la de los individuos no afectados [61, 62], lo que sugiere que la probabilidad de afectar a genes relacionados con el mantenimiento del estado redox celular aumentaría en circunstancias de estrés oxidativo.

Las mutaciones podrían afectar tanto a regiones reguladoras de los genes, situadas principalmente en la región promotora, como a regiones codificadoras que contienen la información que va a ser traducida en la proteína correspondiente. A este respecto, se ha identificado una región de respuesta antioxidante en el promotor de los genes de la quinona reductasa y de una de las subunidades de la glutatión S-transferasa. La quinona reductasa y la glutatión S-transferasa son enzimas que participan en la síntesis de dos importantes antioxidantes celulares, tales como la ubiquinona y el glutatión (GSH). Estas regiones serían las responsables de controlar la transcripción de estos genes y, por lo tanto, sus valores de proteínas como respuesta a un estado de estrés oxidativo [63]. Estas regiones, o similares, pueden estar distribuidas en los promotores de diferentes genes y se podría especular que mutaciones en dichas regiones producirán una respuesta deficiente del gen en casos de estrés oxidativo.

Las mutaciones en las regiones codificadoras pueden dar lugar a proteínas defectuosas en la defensa contra los agentes oxidantes y producir determinadas patologías. A este respecto, y por citar algunos ejemplos, se han detectado mutaciones en el gen del citocromo P₄₅₀, involucrado en el metabolismo de fármacos y en especial de agentes carcinógenos, que podrían estar relacionadas con el

desarrollo de cánceres de pulmón y vesícula urinaria [64]. Por otro lado, mutaciones en el gen que codifica la superóxido dismutasa dependiente de Cu, Zn tipo I (Cu/Zn-SOD) están implicadas en el desarrollo de esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad caracterizada por una degeneración de las neuronas motoras [65].

Finalmente, mutaciones en oxidasas podrían estar relacionadas con determinados tipos de comportamiento. Así, un estudio reciente señala que una mutación puntual en el gen de la monoamino-oxidasa A, enzima mitocondrial codificada por el DNA nuclear, estaría relacionada con comportamientos anormales, retraso mental y agresividad. La causa de ello reside en que la monoamino-oxidasa A está implicada en el metabolismo de serotonina, dopamina y noradrenalina y un metabolismo deficiente de estos neurotransmisores, a causa de la monoamino-oxidasa mutada, podría ser la causa bioquímica de las alteraciones descritas [66].

No todas las mutaciones en un gen dan lugar a un fenotipo mutado, ya que algunas mutaciones no alteran, o sólo afectan parcialmente, la actividad de los productos de los genes. Esto podría explicar las alteraciones progresivas en las defensas antioxidantes que aparecen en algunas enfermedades degenerativas en el transcurso del tiempo.

3.5.4. Estrategias antioxidantes para preservar el material genético.

La importancia del material genético como depositario y vehículo de la información biológica es obvia. Numerosos ejemplos lo demuestran, lo que viene además apoyado por el hecho de que mutaciones puntuales en genes concretos, no sólo ponen en juego la función de proteínas específicas, sino que además llegan a afectar a funciones biológicas importantes como resultado de dicha alteración.

Por esta razón, durante la evolución biológica, la célula ha cuidado especialmente la preservación de su material genético en un orgánulo especializado: el núcleo. Este orgánulo presenta un microambiente adecuado para proteger al DNA frente a agresiones medioambientales nocivas, que incluyen las producidas por agentes oxidantes.

Ante estas agresiones la célula presenta estrategias para preservar el material genético, que pueden clasificarse en 2 grupos: a) mecanismos de prevención del ataque oxidante, y b) mecanismos de reparación, una vez que el DNA ha sido alterado oxidativamente. Dentro del primer grupo (a) se pueden considerar todavía 2

subgrupos: a1) mecanismos de adaptación genética y a2) mecanismos protectores antioxidantes.

3.5.5. Mecanismos de prevención del ataque oxidante.

Mecanismos de adaptación genética. En este apartado se podrían considerar todas las estrategias que el núcleo ha adoptado en el curso de la evolución para hacer menos accesible el DNA al ataque por agentes nocivos, incluidos los agentes oxidantes. En comparación con otros orgánulos intracelulares, el núcleo es un orgánulo poco oxigenado, carece de sistemas enzimáticos que catalicen reacciones redox y de cadenas de transporte de electrones [67]. Estas circunstancias disminuyen la probabilidad de alteraciones en el DNA nuclear. Baste para ello comparar con su homólogo mitocondrial que, como ya se ha comentado, presenta una tasa de mutaciones 10 veces superior al DNA nuclear [68] .

Hay que considerar, además, que el DNA nuclear está altamente protegido por diferentes tipos de moléculas de carácter básico, tales como las poliaminas, protaminas e histonas. Las poliaminas son metabolitos de bajo peso molecular, derivados de ciertos aminoácidos y que poseen varios grupos amino. Su función nuclear parece ser la estabilización del DNA y de microfilamentos involucrados en el mantenimiento de la estructura del núcleo [69]. Las protaminas son proteínas altamente básicas (80-85% de arginina) que se conjugan con el DNA en el núcleo del espermatozoide, manteniéndolo en una conformación compacta, menos accesible al ataque por agentes mutagénicos [70].

Las protaminas y la poliamina espermina son las moléculas principales encargadas de mantener la estructura de empaquetamiento y de la protección del DNA en el espermatozoide [71, 72].

Las histonas son moléculas de naturaleza proteica e interaccionan reversiblemente con el DNA, a través de regiones básicas ricas en lisina. A la vez son componentes esenciales del nucleosoma, la unidad de empaquetamiento del DNA; sin embargo, parecen tener un papel más dinámico, ya que se ha descrito su participación en la transcripción [73].

Dentro de las estrategias de adaptación genética, habría que señalar el hecho de que la mayor parte del DNA nuclear, en el ser humano, no codifica ni para proteínas ni para RNA esenciales. Se estima que más del 90 % del DNA es no codificador.

La presencia de este DNA, a primera vista inservible, parece ser el resultado de una estrategia evolutiva. En principio, todo gen está sujeto a un riesgo de mutaciones y está bien establecido que éstas se producen al azar. De esta forma, cuantos más genes posee un organismo, mayor es la probabilidad de que al menos en uno de ellos se produzca una mutación. Por lo tanto, limitar el número de genes por unidad de longitud de DNA disminuye la probabilidad de mutación [74].

Finalmente, los organismos diploides entre los que se encuentra el hombre han desarrollado la estrategia de tener una doble copia para cada gen, ya que poseen dos dotaciones cromosómicas, una del progenitor masculino y otra del femenino. Esta estrategia permite a la célula disponer siempre de un gen de reserva en el caso de que uno se inactive a causa de una mutación. Naturalmente, esta premisa es válida tan sólo en el caso de que el cromosoma donde esté contenido el gen no haya sido inactivado [74].

3.5.6. Mecanismos protectores antioxidantes nucleares.

Todos los sistemas antioxidantes celulares están implicados en la protección de las macromoléculas biológicas esenciales, entre las que se encuentra el DNA. Sin embargo, el núcleo celular posee sus mecanismos antioxidantes propios todavía poco caracterizados. En este sentido, el interior nuclear posee el doble de concentración del antioxidante GSH (glutatión reducido) que el citoplasma celular [75]. Además, en los poros nucleares se ha descubierto la presencia del Bcl-2, una proteína que se ha descrito que participa en determinadas respuestas antioxidantes [76].

Curiosamente, en líquido seminal se han encontrado altas concentraciones de ácido ascórbico (antioxidante), cuya función biológica podría ser la protección del DNA portado por los espermatozoides. Se ha descubierto, además, que las concentraciones de ácido ascórbico en el esperma varían con el estado nutricional [77], indicando la importancia del factor dietético en la defensa antioxidante así como la función que desempeña la dieta en la preservación del material hereditario.

3.5.7. Mecanismos de reparación.

En este punto habría que considerar los mecanismos de reparación del DNA nuclear una vez que ha sido alterado en circunstancias de estrés oxidativo. La célula ha desarrollado mecanismos altamente precisos en reparación del DNA. Hay que señalar que los mecanismos de reparación del DNA, por alteraciones debidas al estrés

oxidativo, no difieren de los mecanismos reparadores ante cualquier otro tipo de alteraciones no oxidativas.

La reparación del DNA está altamente condicionada por el ATP y el dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado (NAD^+) [78, 79], lo que demuestra la dependencia de los sistemas reparadores de los niveles energéticos y de los niveles redox celulares, es decir, de la mitocondria. Las principales lesiones al DNA son la eliminación de determinadas secuencias, que pueden ir desde una a varias bases, produciendo discontinuidad en una de las hebras del DNA y, en segundo lugar, la presencia de bases erróneas que dan lugar a zonas con desapareamientos.

Es importante recalcar que la información de al menos una de las hebras de DNA se conserve y ésta es la que servirá de base a los sistemas de reparación. Existen sistemas altamente complejos y en ellos intervienen varios tipos de enzimas con diferentes funciones: a) endonucleasas y exonucleasas que eliminan los grupos de bases erróneo o dañados en los casos de desapareamientos de bases; b) glicosilasas y polimerasas que rellenan los huecos producidos, bien como resultado de la lesión o bien por la acción de las endo y exonucleasas, con las bases correctas y complementarias de la otra hebra, y c) ligasas que unen los nucleótidos a la antigua hebra de DNA, de tal forma que ésta sea continua nuevamente [80].

Los genes que son transcritos más frecuentemente (regiones funcionales del DNA) son aquellos que la células tienen más interés a mantener intactos, ya que en caso de información errónea, esta tendría consecuencias fatales para la célula [81]. En este sentido se ha descrito un sistema de reparación acoplado a la maquinaria de transcripción, que verificaría la información contenida en el DNA antes de ser transcrita a RNA mensajero y posteriormente traducida a proteína [82].

En determinadas circunstancias de estrés oxidativo, un gran número de genes que codifican proteínas involucradas en la reparación del DNA son activados. Una gran parte del genoma de los seres vivos codifica dicho esas proteínas reparadoras. En levaduras se ha estimado que el 1% de los genes están implicados directa o indirectamente en la reparación del DNA [83]. En los organismos superiores se desconoce la cifra exacta, pero se sabe que además de los genes directamente implicados en la reparación del DNA, se activan genes que codifican proteínas

protectoras como la hemoxigenasa o las metalotioneínas [84] y genes implicados en detener el crecimiento celular para reducir la tasa de mutación [85].

Determinados estados patológicos y de estrés oxidativo pueden estar relacionados con mutaciones en genes involucrados en la reparación del DNA. En este sentido, determinados cánceres de colon están relacionados con mutaciones en genes reparadores del DNA [86] y durante el envejecimiento celular hay un descenso en la efectividad de la maquinaria reparadora [87]. Sin embargo, la reparación del DNA es un proceso del que se conoce todavía muy poco, y en el que hay que considerar muchas variables, tales como el tipo de lesiones producidas en el DNA, el estado de diferenciación de la célula, el tipo de tejido donde se encuentra la célula y la composición del medio extracelular (presencia o ausencia de factores de crecimiento, mediadores de la inflamación, etc.), que sin lugar a dudas van a influir en ese proceso [88].

En conclusión, las modificaciones oxidativas en el DNA contribuyen, asociadas con otras modificaciones no oxidativas, a la aparición de mutaciones y alteraciones genéticas que podrían explicar, en parte, determinadas patologías de origen genético y que en un principio no se sospechaban como producidas por estrés oxidativo. En este sentido la terapia y la ingeniería podrían desempeñar un importante papel en el futuro. Así, estudios realizados con moscas *Drosophila* transgénicas expresando 3 copias de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa, muestran un incremento en la esperanza de vida de un tercio más que las moscas normales [89]. Aunque este tipo de resultados parece presagiar un futuro esperanzador e inquietante, en el caso del hombre este tipo de manipulaciones están todavía muy lejos de ser realizadas.

3.6. Métodos de detección de fragmentación del DNA espermático.

Existen varios métodos para medir los niveles de fragmentación. La prueba de TUNEL del inglés (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling), es recomendada por líderes de opinión en estudios de fragmentación de DNA [90].

La mayoría de las pruebas de fragmentación, incluyendo la prueba Ensayo de la Estructura de la Cromatina Espermática SCSA del inglés (Sperm Chromatin Structure Assay) y la prueba Dispersión de la Cromatina Espermática SCD del inglés (Sperm Chromatin Dispersion) miden el daño potencial y la susceptibilidad a la desnaturalización del DNA y por ello tienen un nivel predictivo más bajo. Por el contrario, la prueba de TUNEL mide daño real y tiene un alto valor predictivo en

técnicas de reproducción asistida. Actualmente el valor de corte de normalidad recomendado para la prueba de TUNEL es de $< 15\%$.

Para realizar la prueba de TUNEL, los espermatozoides con DNA fragmentado con los extremos 3-OH libres reaccionan con una enzima transferasa terminal e incorporan dUTP biotinilado, para ampliar la señal se aplica el complejo avidina-biotina-peroxidasa quien permite realizar el revelado con diaminobenzidina 0.05% y peróxido de hidrogeno 0.05% y muestran una coloración parda por microscopia de campo claro y un color verde fluorescente, si se visualizan por microscopia de fluorescencia.

3.7. Indicaciones clínicas

La prueba de fragmentación del DNA espermático se recomienda en los siguientes casos [11]:

1. Infertilidad idiopática (de causa desconocida).
2. Fallos repetidos en técnicas de reproducción asistida.
3. Casos con una mala calidad embrionaria.
4. Pacientes que han sufrido abortos de repetición.
5. Varicocele.
6. Varones con edad superior a los 45 años.
7. Casos de congelación de semen (se comprueba que la muestra congelada tenga unos niveles de fragmentación aceptables).
8. Episodio febril en los últimos 3 meses.

3.8. Fragmentación del DNA en pacientes con diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es una enfermedad con una alta morbilidad y mortalidad, por lo que sus efectos se han estudiado en relación con los diversos órganos a los que afecta, sin ser la función reproductora la excepción.

En ratas con diabetes inducida, las alteraciones reproductivas se han asociado con alteraciones a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, tanto por disminución de la secreción de GnRH, como por la deficiente secreción de LH, FSH y prolactina, así como por alteraciones en gónadas y producción de hormonas esteroideas

(testosterona, estrógenos y progesterona). Esto trae como consecuencia, en ratas macho, la menor producción y disminución en la movilidad de los espermatozoides.

En diversos estudios se ha observado la prevalencia de malformaciones congénitas, en los productos de ratas con diabetes inducida con estreptozotocina, siendo las más frecuentes: Retraso en el desarrollo, alteraciones en el cierre del tubo neural, alteraciones cardíacas y micrognatias entre otros.

3.9. Importancia de estudiar la fragmentación y protección del DNA.

La integridad genética de los espermatozoides se está convirtiendo en un nuevo parámetro para la evaluación de la fertilidad masculina, que se añade a los tradicionales, como la cantidad, la morfología y la movilidad (Figura 3).

El daño al DNA puede ser debido a exposición excesiva a las radiaciones, lo que no es frecuente en la población general, se cree que también a un exceso de radicales libres producidos en el propio organismo, como en el caso de los pacientes diabéticos. Su exceso se asocia, según algunos estudios, al déficit de sustancias antioxidantes en la dieta y al consumo de tabaco.

Todo parece apoyar la hipótesis ambiental en detrimento de la genética como causa de algunos tipos de infertilidad masculina, ya que podría ser debido a determinadas sustancias que directa o indirectamente afecten el DNA del espermatozoide causando su fragmentación.

Como se mencionó el estrés oxidativo post-testicular, durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo, puede producir fragmentación del DNA espermático.

Uno de los mecanismos principales es el relacionado con la producción de radicales libres, ya sea por espermatozoides inmaduros o por las células epiteliales del epidídimo, que dañan directamente el material genético del espermatozoide. Además, la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas por factores tóxicos y y temperaturas elevadas también puede inducir fragmentación del DNA.

El tratamiento con antioxidantes puede reducir significativamente los niveles de fragmentación de DNA. Aún así, existe la posibilidad de que algunos pacientes no respondan al tratamiento, sobre todo cuando el daño de DNA es inducido por

factores tóxicos o altas temperaturas que activan caspasas y endonucleasas espermáticas. En estos casos la práctica recomendada sería el uso de espermatozoides procedentes de testículo, ya que se ha observado que su grado de fragmentación suele ser significativamente menor.

Por tanto, la protección del DNA espermático aumentaría la tasa de éxitos en los programas de reproducción asistida.

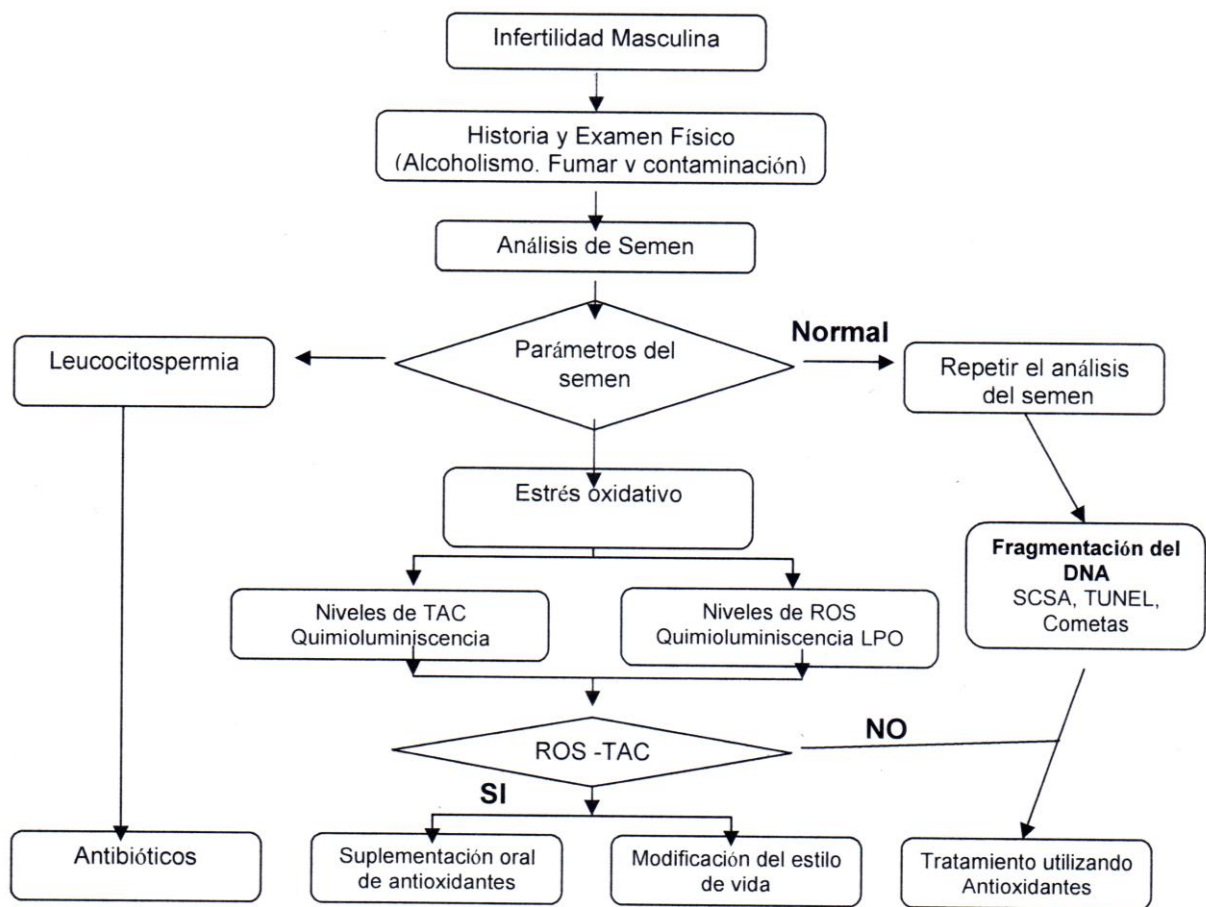


Figura 3. Procedimiento recomendado para la evaluación de la fertilidad masculina.

3.10. Las poliaminas.

Las poliaminas son un grupo de pequeñas moléculas alifáticas (no cíclicas), cuya característica es poseer dos o más grupos amino en su estructura. Aunque existen en la naturaleza varias moléculas con estas características, tres de ellas han sido las más estudiadas, ya que existe una estrecha relación en su biosíntesis e interconversión en el organismo, además de que se han implicado en numerosos procesos celulares. Estas moléculas son la putrescina, la espermidina y la espermina, cuyas fórmulas aparecen a en la Figura 4.

Putrescina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Espermidina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Espermina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

Figura 4. Estructura de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina.

El descubrimiento de la función de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en la regulación de diversos procesos tales como crecimiento, multiplicación y diferenciación celular, ha despertado gran interés por su estudio en diversas áreas de investigación. Estas moléculas, a semejanza de los ácidos nucleicos, los aminoácidos y las proteínas, se encuentran distribuidas ampliamente en los sistemas vivos, lo que quizá constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular crecimiento, multiplicación y diferenciación celular [91].

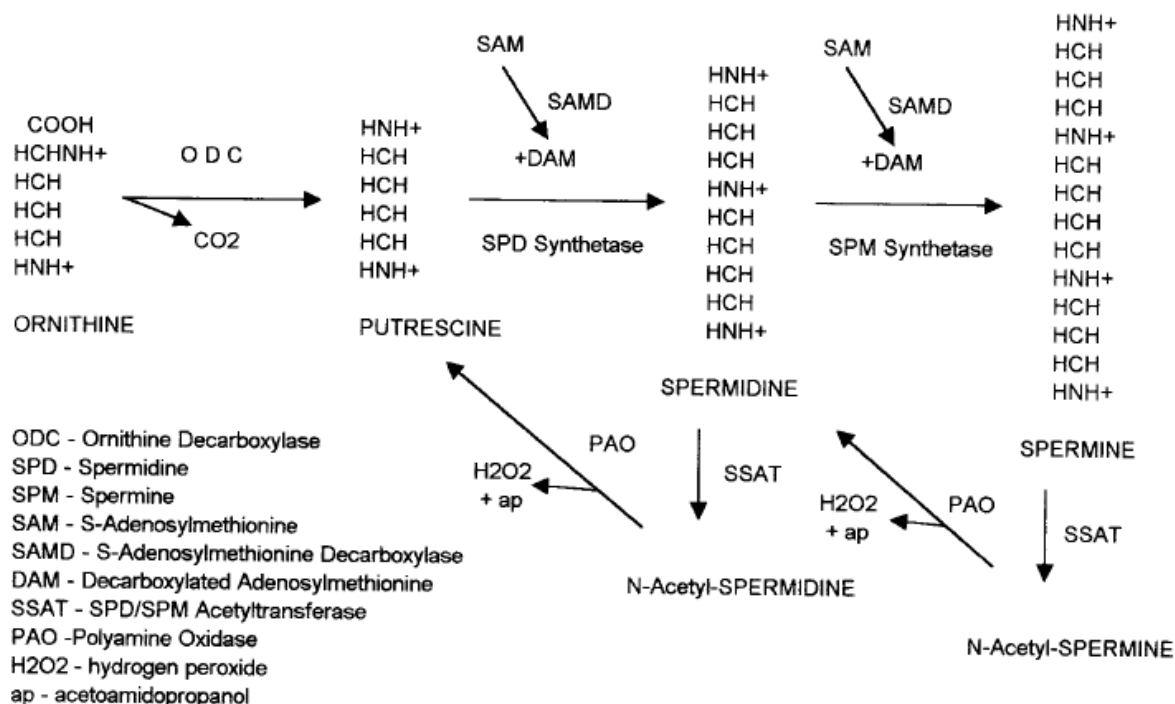


Figura 5. Biosíntesis e interconversión de poliaminas en mamíferos.

Las poliaminas (putrescina (1,4-butanodiamina), espermidina (N-(3-aminopropil)-1,4-butanodiamina), y espermina (N,N'-bis(3-aminopropil)-1,4-butanodiamina) son pequeños policationes solubles, químicamente estables, biológicamente activos y ampliamente distribuidos en todos los organismos vivos. Su característica más singular es el carácter polibásico, que les confiere una alta afinidad por constituyentes ácidos y es, probablemente, un importante determinante de sus funciones biológicas.

Las interacciones electrostáticas con el DNA, el RNA, las proteínas y los constituyentes cargados negativamente en las membranas biológicas, constituyen la base para la mayoría de las funciones de las poliaminas. En este sentido, a pesar del largo tiempo transcurrido desde su descubrimiento y establecimiento de su estructura química, sólo en los últimos 30 años, con el desarrollo de técnicas analíticas adecuadas para su determinación y la obtención de inhibidores específicos de su metabolismo, se han intensificado las investigaciones para comprender el papel de las poliaminas en los diferentes procesos celulares que las relacionan con el crecimiento, la diferenciación y la multiplicación celular.

Los primeros estudios demostraron que las poliaminas estimulan el crecimiento de los procariontes y células eucariotas, desempeñan un papel importante en la

carcinogénesis y en los procesos de transformación maligna. Como resultado de estos estudios se han sintetizado distintos inhibidores de la biosíntesis de poliaminas y se utilizan para combatir el cáncer y las enfermedades parasitarias [92].

3.11. Fisiología de las poliaminas en el sistema reproductor masculino.

La investigación sobre el papel fisiológico de las poliaminas relacionadas con el aparato reproductor masculino, ha sido tema de gran interés en la comunidad científica. Mucha de la información obtenida proviene de experimentos de laboratorio con animales donde se ha estudiado el metabolismo de las poliaminas en la próstata, el semen y los testículos [93].

3.11.1. Testículos.

Susuki y cols, [94] determinaron la actividad de la poliamina-oxidasa en varios órganos humanos. La concentración de poliaminas fue mayor en el hígado, seguido por la del testículo (339 ± 280 nmol / g peso húmedo por 30 minutos). La elevada actividad en el testículo puede estar relacionada con el proceso de espermatogénesis [95].

3.11.2. Próstata.

En el hombre y en otros mamíferos, la espermina seminal deriva de la glándula prostática. [96]. El análisis de las poliaminas en el tejido prostático de animales maduros sexualmente reveló que hay grandes cantidades de espermidina y espermina [97]. Otras observaciones indican que varios lóbulos de la glándula prostática de conejo, ratón, cobayo y perro presentan un contenido de espermidina y espermina dentro del rango que hay en muchos otros tejidos no genitales. Los lóbulos ventral y dorso-lateral de próstata de rata son depósitos de grandes cantidades de espermidina y espermina, similares a los encontrados en la próstata de humanos [98].

Las enzimas que intervienen en la biosíntesis de poliaminas como la ornitina descarboxilasa (ODC) [99], se han purificado de la próstata de la rata [100] y en algunos casos de la próstata humana, especialmente la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMD) [101].

3.11.3. Semen.

El semen humano normal contiene espermina en concentraciones de 5 a 15 mM [102, 103], pequeñas cantidades de espermidina y [104] baja concentración de putrescina, pero fácilmente detectables y 1,3-diaminopropano. La relación espermina /espermidina en el semen humano es superior a 12 [105]. El hecho de que la concentración de espermina en el semen humano sea mucho mayor que en cualquier otro tejido y fluido corporal, conduce a diversas especulaciones en cuanto a su papel fisiológico. Se encontró que la espermina no afecta a la motilidad de los espermatozoides humanos y bovinos *in vitro*. Otros reportes indican que la espermina no tiene efecto benéfico, ni perjudicial sobre la motilidad o metabolismo de los espermatozoides de mamíferos cuando se añade *in vitro* [106]. Algunos investigadores informaron que la espermina activa la motilidad espermática de espermatozoides de humanos y de conejo. [108-109] Se ha obtenido evidencia *in vitro* que la espermina también aumenta la actividad de maltasa seminal, la cual participa en la degradación del glucógeno y aumenta la utilización de glucosa por el espermatozoide, al mismo tiempo reduce la utilización de la fructosa [110].

La adición de cantidades fisiológicas de espermina a suspensiones de espermatozoides causan un aumento de la cantidad de AMPc [110], un nucleótido que induce la capacitación en los espermatozoides humanos [111]. El efecto de la espermina sobre los niveles del AMPc puede ser explicado por que la poliamina inhibe la actividad de la fosfodiesterasa que hidroliza el AMPc. En especial se está prestando particular atención al carácter antioxidante de las poliaminas y su papel en procesos inflamatorios, traumáticos, cáncer, etc. [112, 113].

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las células germinales son altamente especializadas, cuya función es la transferencia de la información genética de una generación a otra. El DNA es el responsable de la transmisión de esa información, por lo tanto su fragmentación conduce a alteraciones en el proceso reproductivo. A pesar de que hay información relacionada con el efecto de la glucosa sobre el DNA, no hay reportes relacionados con el efecto de la hiperglucemia sobre el DNA en el proceso de maduración espermática.

5. HIPÓTESIS.

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina protegen al DNA *in vitro* de la fragmentación en condiciones de hiperglucemia.

6. OBJETIVO.

Estudiar la protección, *in vitro*, del DNA aislado de espermatozoides de diferentes regiones del epidídimo de borrego con las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina en condiciones de hiperglucemia.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Material Biológico.



Figura 6. Rastro Agropecuario de Milpa Alta de donde fue obtenido el material biológico (A y B).

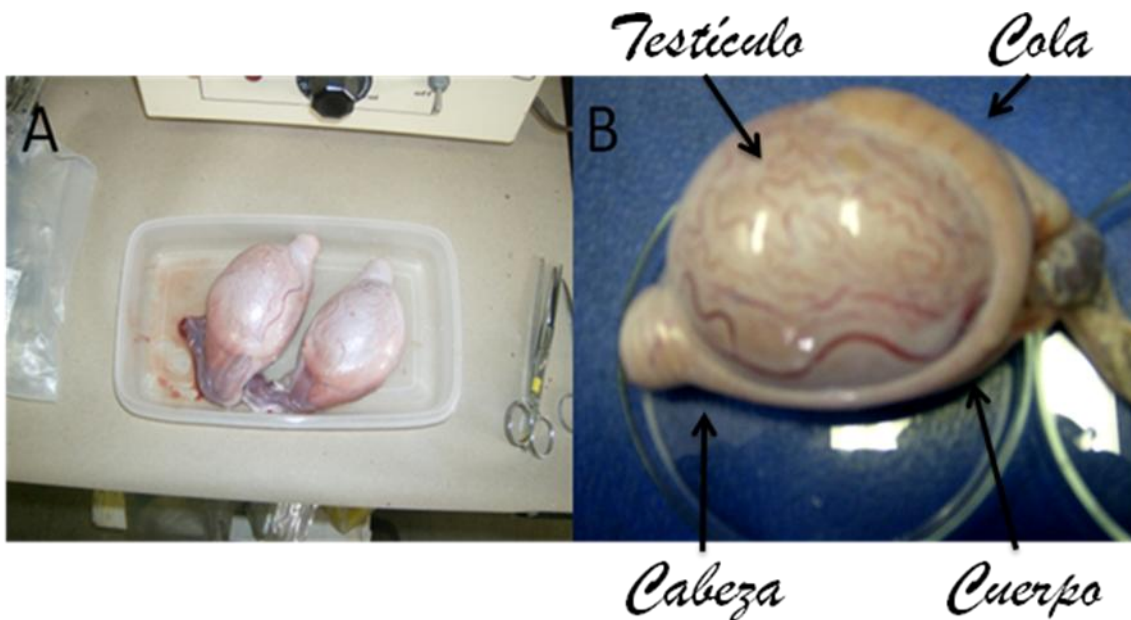


Figura 7. Los testículos de borrego fueron mantenidos en hielo durante el trayecto del rastro al Laboratorio (A). Las diferentes regiones del epidídimo; cabeza, cuerpo y cola son señaladas.

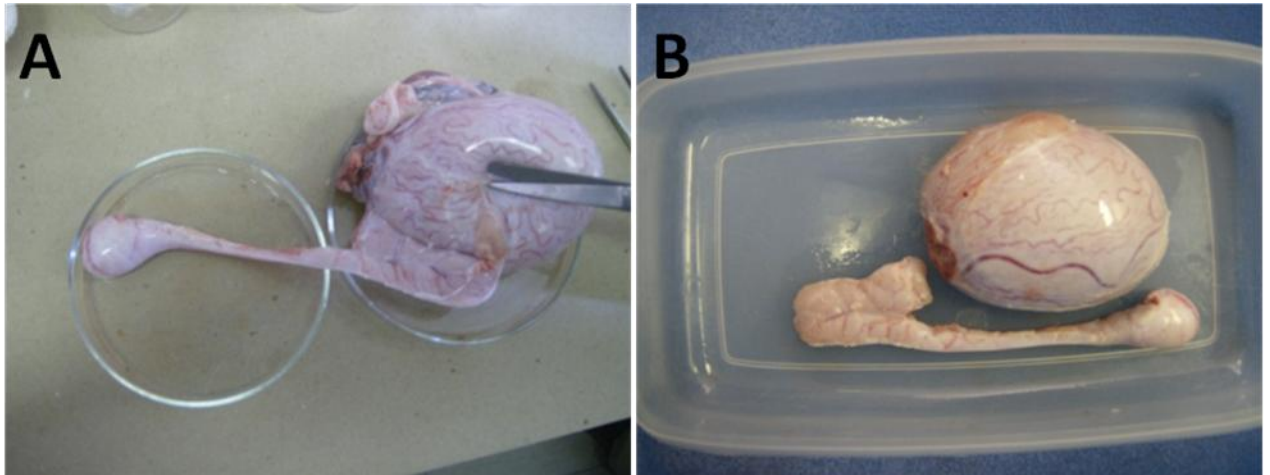


Figura 8. Se realizó cuidadosamente la disección del epidídimo (A y B).

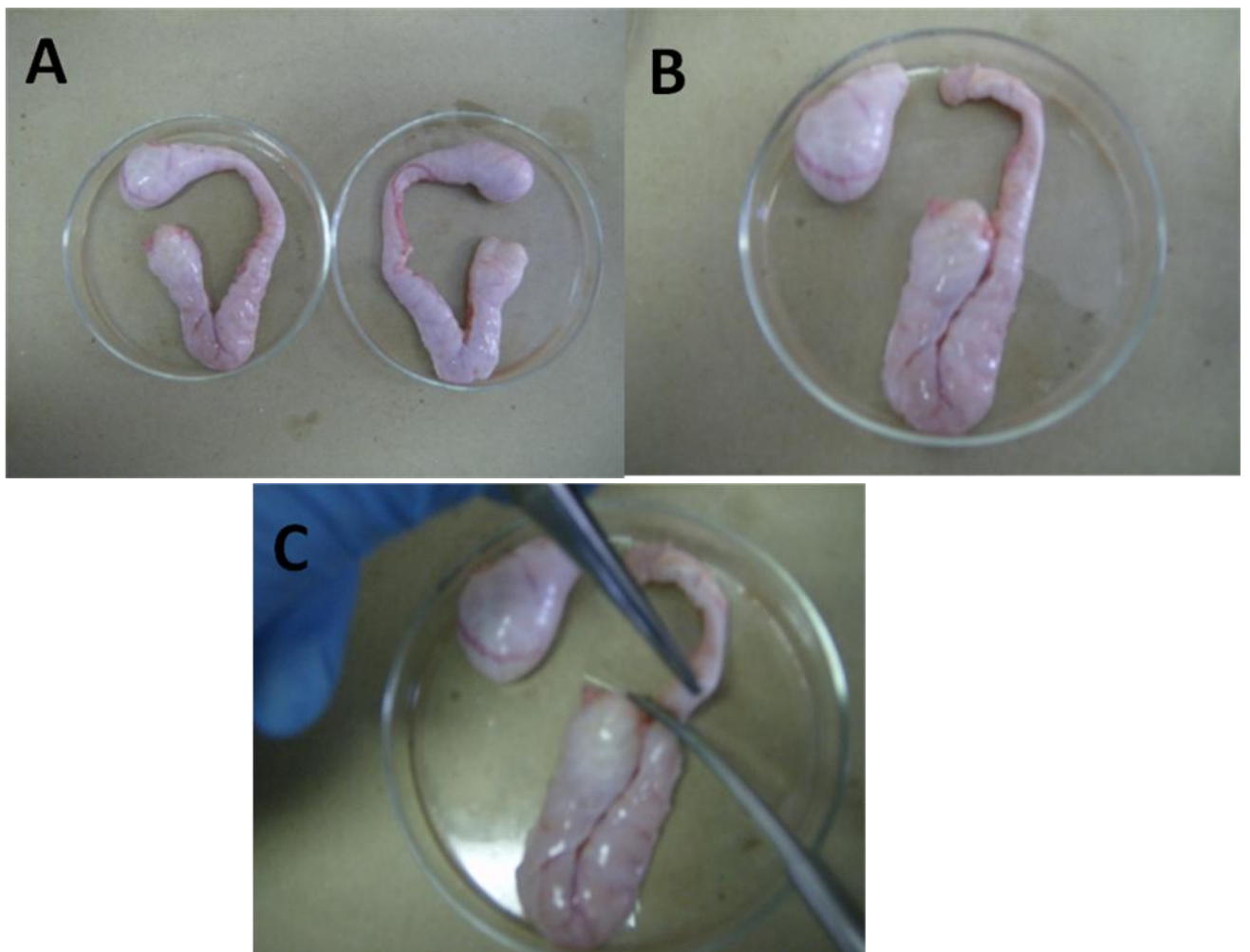


Figura 9. Epidídimo fraccionado en sus tres partes: cabeza, cuerpo y cola (A, B y C)

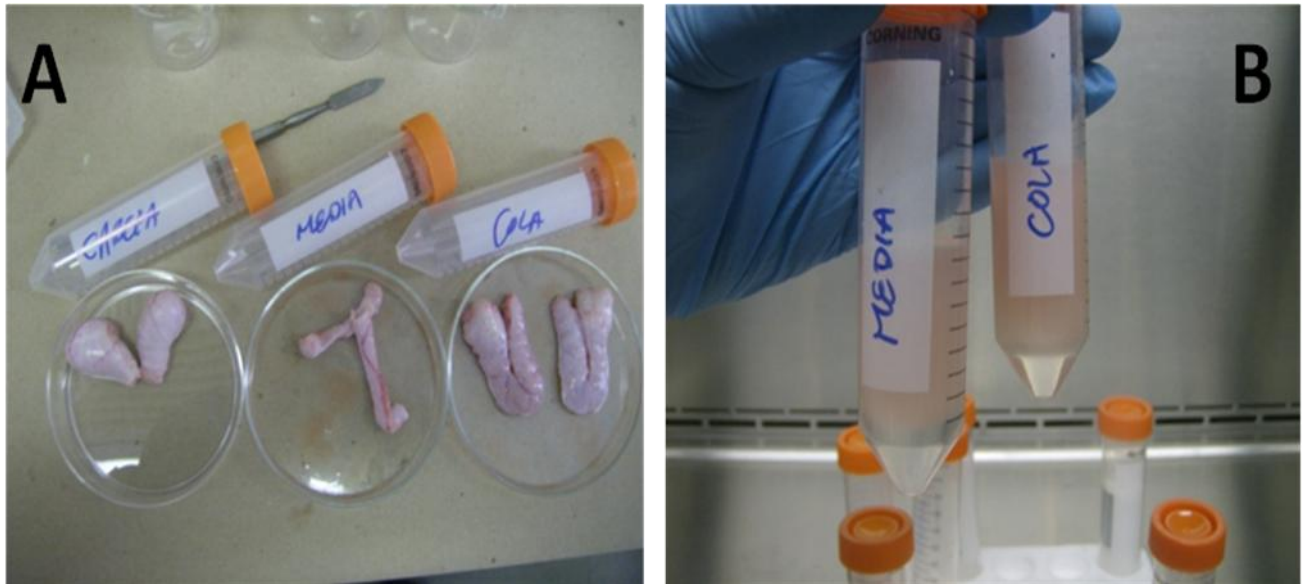
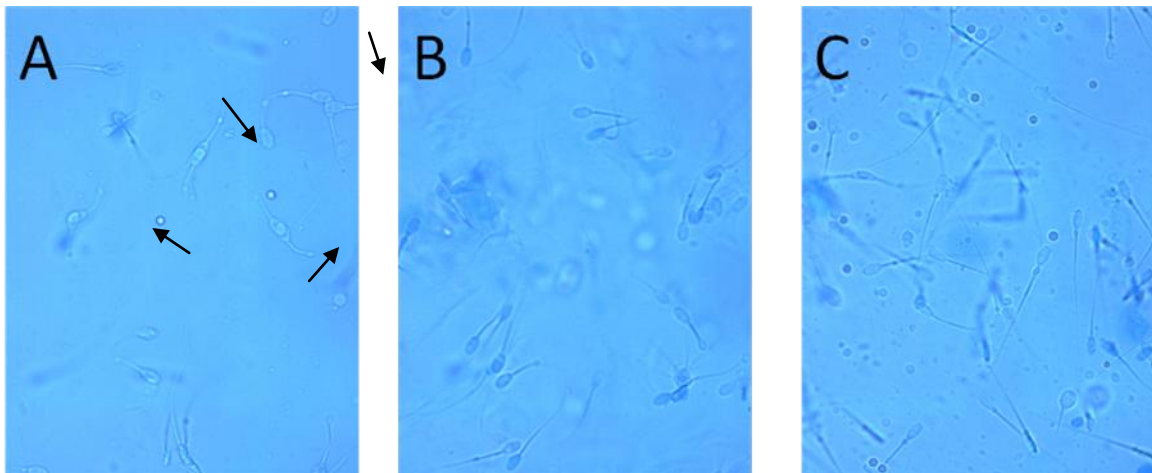


Figura 10. Cada región del epidídimo fue procesada por separado y los espermatozoides fueron recuperados por filtración en gasa (A y B).



Figuras 11. Observación de las características morfológicas de los espermatozoides de cabeza (A), cuerpo (B) y cola (C) de epidídimo de borrego.

7.2. Procedimiento experimental extracción de DNA.

El DNA es sumamente susceptible a la acción de las desoxirribonucleasas las cuales están dondequiera: Las manos, el equipo, las soluciones, etc. Por esta razón el área de trabajo fue cuidadosamente desinfectada y el material empleado fue esterilizado y preferentemente desechable.

7.3. Método de extracción de DNA.

1. Para evitar la contaminación espermática por otro tipo de células tales como linfocitos y células epiteliales, las muestras se sometieron un gradiente de Ficoll-Paque en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.
2. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 30 minutos a 20 °C.
3. Una vez decantado el sobrenadante, el botón de células espermáticas fue lavado dos veces más con solución salina estéril y resuspendido en un agitador (Vortex Genie 2), con 10 ml de Tris-EDTA-SDS-DTT (0.15 M - 0.015 M - 2 % - 1 mM) estéril para romper las membranas citoplásmica y nuclear de acuerdo al procedimiento descrito por Méndez [114], liberando así el DNA.
4. Se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Se calentó el homogeneizado 10 minutos a 60 °C en baño maría para desnaturalizar proteínas y se dejó enfriar.
6. Se adicionaron 2.5 ml de NaClO₄ 5 M estéril para tener una concentración final 1 M.
7. Se adicionaron 12.5 mL de cloroformo y 1.25 mL de alcohol isoamílico para extraer los lípidos.
8. Se agitó la mezcla durante 20 minutos y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos.
9. Se separó la parte superior con una pipeta Pasteur y se adicionó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico.
10. Se agitó 20 minutos y se centrifugó. Este paso se repitió hasta que la fase intermedia desapareció.
11. Se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío a la fase acuosa para precipitar el DNA, el cual fue colectado con una varilla de vidrio.
12. La muestra se centrifugó y se deshidrató a 37 °C.
13. Finalmente se resuspendió la muestra con 35 ml de NaCl 0.154 M estéril.
14. El extracto del DNA fue cuantificado por espectrofotometría ultravioleta por triplicado para determinar su concentración, la longitud de onda

utilizada fueron 260 nm y una densidad óptica de 1,0 correspondió a una concentración de 50 μg de DNA por mL.

7.4. Procedimiento experimental gel de agarosa.

Después de que el gel polimerizó, se retiró el peine y se colocó el gel en la cámara apenas cubriéndolo con el amortiguador. Se aplicaron las muestras (5 μl) en los pocillos, con solución de carga (2 μl), se colocó la tapa y se conectó la cámara a la fuente de poder, a 80 volts por 40 minutos. Se pudo confirmar el paso de la corriente al observar el desprendimiento de burbujas de los electrodos. El DNA migró hacia el ánodo. La distancia a la que el DNA había migrado en el gel pudo calcularse monitoreando la migración del colorante indicador azul de bromofenol. Este colorante migra a una velocidad aproximada a la de fragmentos de DNA doble hebra de 300 pares de bases.

Cuando la migración es adecuada, los fragmentos de DNA son visualizados con bromuro de etidio. Esta molécula fluorescente se intercala entre las bases del DNA. El bromuro de etidio puede incorporarse al gel o se puede teñir el gel después de la corrida sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio. Para visualizar el DNA o el RNA, el gel se coloca sobre un transiluminador UV y se fotografía.

7.5. Evaluación de DNA.

Una vez extraído el DNA se procedió a verificar su calidad en un gel de agarosa al 1% por medio de electroforesis (Mini-Sub Cell GT BIO-RAD) durante 40 minutos a 80 voltios. El gel se teñió con bromuro de etidio, una vez que entra, cambia de forma y fluoresce en con luz ultravioleta. Es mutagénico y por lo tanto fue manejado con guantes y con mucho cuidado.

7.6. Condiciones experimentales.

Tabla 1. Condiciones experimentales. Los espermatozoides fueron obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo, se obtuvo el DNA, se cuantificó y se ajustó a 200 μg .

Condición	Cabeza	Cuerpo	Cola
	450 µl soln. salina	450 µl soln. salina	450 µl soln. salina
	50 µl DNA	50 µl DNA	50 µl DNA
Lectura (Stock)	0.5125	0.1607	0.1268
X 10	5.125	1.607	1.268
Si 1.0 U = 50 µg	256.25 µg	80.35 µg	63.4 µg
Ajustando a 200 µg de DNA	39 µl	124.5 µl	157.7 µl
Soln. Salina 1.0 ml	951 µl	865.5 µl	823.3 µl
Poliaminas 10 mM	10 µl	10 µl	10 µl

Poliamina	PM (g mol)	1 Mol / 1 ml (g)	10 µl (mg)	Conc. Final (mM)
Espermina	348.2 ⁻¹	0.348	3.48	10
Espermidina	254.6 ⁻¹	0.254	2.54	10
Putrescina	161.09 ⁻¹	0.161	1.61	10

La presencia de DNA de alto peso molecular y no de fragmentos pequeños se visualizó en el fotodocumentador, las imágenes fueron capturadas en el programa Alphamager 3.24I;

Según la presencia, integridad y calidad del DNA extraído se procedió a realizar la incubación del DNA a 35 °C por 30 días con glucosa 5.5 mM, ó 30 mM, Poliaminas: (espermina, espermidina y putrescina 10 mM), glucosa 5.5 mM con poliaminas 10 mM y glucosa 30 mM con poliaminas 10 mM.

Tabla 2. Protocolo de incubación a 35 °C del DNA de espermatozoides borrego: cabeza, cuerpo y cola del epidídimo.

DNA recién aislado	DNA y glucosa fisiológica	DNA e hiperglucemia	DNA y poliaminas	DNA, glucosa fisiológica y poliaminas	DNA e hiperglucemia y poliaminas
200 µg	Glucosa 5.5 mM	Glucosa 30 mM		Glucosa 5.5 mM	Glucosa 30 mM
200 µg			Putrescina 10 mM	Putrescina 10 mM	Putrescina 10 mM
200 µg			Espermidina 10 mM	Espermidina 10 mM	Espermidina 10 mM
200 µg			Espermina 10 mM	Espermina 10 mM	Espermina 10 mM

Tabla 3. Lectura de absorbancia del DNA a 260 nm de longitud de onda.

Poliaminas sin Glucosa						
	Espermina Basal	Espermina Experimental	Espermidina Basal	Espermidina Experimental	Putrescina Basal	Putrescina Experimental
Cabeza	0.18483	0.19096	0.22766	0.26760	0.1742	0.25316
Cuerpo	<u>0.13477</u>	<u>0.12252</u>	0.16275	0.1922	0.10456	0.18211
Cola	<u>0.23962</u>	<u>0.19339</u>	0.25540	0.26926	0.23368	0.29418
Glucosa 5.5 mM						
	Espermina Basal	Espermina Experimental	Espermidina Basal	Espermidina Experimental	Putrescina Basal	Putrescina Experimental
Cabeza	0.19658	0.23147	0.2219	0.2526	0.18494	0.21415
Cuerpo	0.11207	0.14825	0.15496	0.18786	0.09766	0.2035
Cola	<u>0.27512</u>	<u>0.25387</u>	0.27633	0.30949	0.22032	0.24671
Glucosa 30 mM						
	Espermina Basal	Espermina Experimental	Espermidina Basal	Espermidina Experimental	Putrescina Basal	Putrescina Experimental
Cabeza	0.19572	0.24821	0.17964	0.24605	0.18770	0.23592
Cuerpo	0.10320	0.12862	0.16477	0.19418	0.11493	0.18659
Cola	<u>0.24405</u>	<u>0.23969</u>	0.25266	0.27901	<u>0.25509</u>	<u>0.25200</u>

8. RESULTADOS.

Con la idea de seguir una secuencia, se presentan primero los resultados de los estudios electroforéticos y después los estudios de espectroscopía ultravioleta del DNA en estado nativo y después de haber sido sometido a las diferentes condiciones experimentales.

8.1. Integridad del DNA recién aislado de espermatozoides obtenidos de epidídimo de borrego por electroforesis en gel de agarosa.

En la Figura 15 se muestra la integridad del DNA recién aislado obtenido de espermatozoides de las tres regiones del epidídimo. Como puede apreciarse el DNA pudo obtenerse altamente polimerizado utilizando una metodología sencilla y rápida. En ninguno de los casos se observó fragmentación.

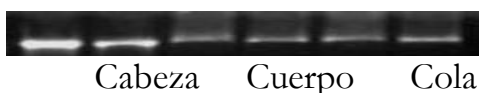


Figura 15. La integridad del DNA recién aislado obtenido de espermatozoides de borrego: cabeza, cuerpo y cola del epidídimo fue visualmente corroborada por electroforesis en agarosa al 1.0 %, utilizando bromuro de etidio.

8.2. Integridad del DNA recién aislado obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo por electroforesis en gel de agarosa incubado con glucosa 5.5 mM y 30 mM.

En la Figura 16 (Día cero) se observó que las bandas de DNA están íntegras, no se observó fragmentación o degradación del DNA cuando se mezcla con glucosa e inmediatamente se somete a electroforesis.

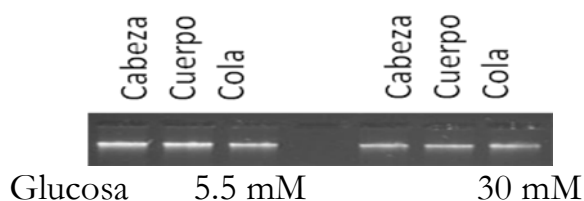


Figura 16. DNA de espermatozoides de borrego aislado de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo con glucosa 5.5 mM y 30 mM (Día cero).

8.3. Integridad del DNA recién aislado obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo por electroforesis en gel de agarosa incubado con las poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM.

En la Figura 17 (Día cero) se observó que las bandas de DNA están íntegras, no se observó fragmentación o degradación del DNA cuando se mezcla con poliaminas e inmediatamente se somete a electroforesis.

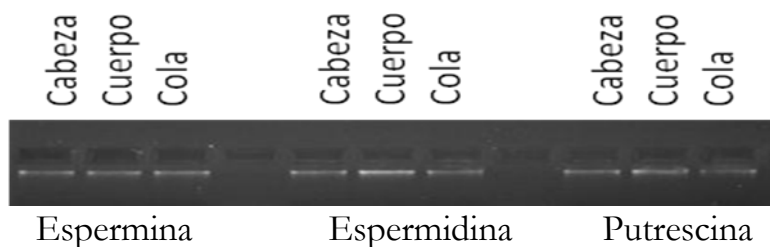


Figura 17. DNA de espermatozoides de borrego aislados de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo con poliaminas: espermina, espermidina y putrescina 10 mM (Día cero).

8.4. Integridad del DNA recién aislado obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo por electroforesis en gel de agarosa incubado con glucosa 5.5 mM y con las poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM.

En la Figura 18 (Día cero) se observó que las bandas de DNA están íntegras, no se observó fragmentación o degradación del DNA cuando se mezcla con glucosa 5.5 mM y poliaminas e inmediatamente se somete a electroforesis.

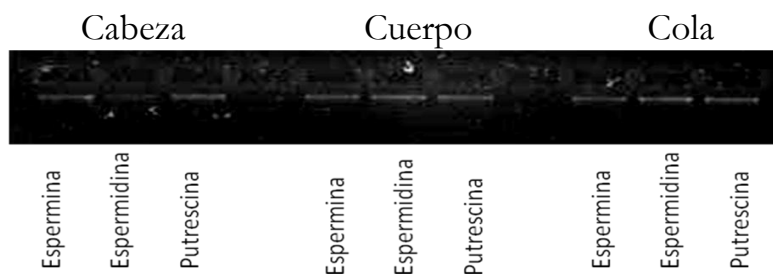


Figura 18. DNA de espermatozoides de borrego aislado de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo con glucosa 5.5 mM y con poliaminas: espermina, espermidina y putrescina 10 mM (Día cero).

8.5. Integridad del DNA recién aislado obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo incubado con glucosa 30 mM y con las poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM.

Figura 19. DNA de espermatozoides de borrego aislado de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo con glucosa 30 mM y con poliaminas: espermina, espermidina y putrescina 10 mM (Día cero).

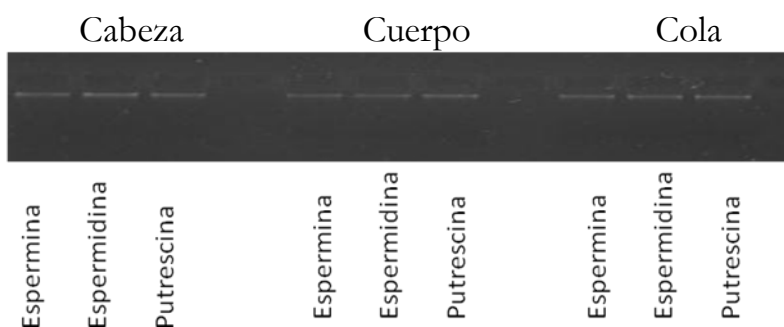


Figura 19. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo con glucosa 30 mM y con poliaminas: espermina, espermidina y putrescina 10 mM (Día cero).

8.6. Aspectos comparativos de la electroforesis del DNA obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo con glucosa 5.5 mM y 30 mM.

En la Figura 20 se observó que las bandas de DNA están íntegras, no se observó fragmentación del DNA después de 30 días de incubación a 35 °C, en presencia de las dos concentraciones de glucosa estudiadas.

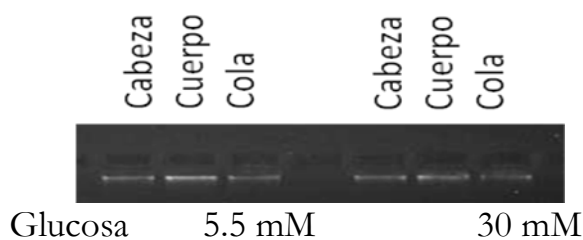


Figura 20. DNA de espermatozoides de borrego de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo incubado durante 30 días a 35 °C, con glucosa 5.5 mM y 30 mM.

8.7. Aspectos comparativos de la electroforesis del DNA obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo en presencia de poliaminas.

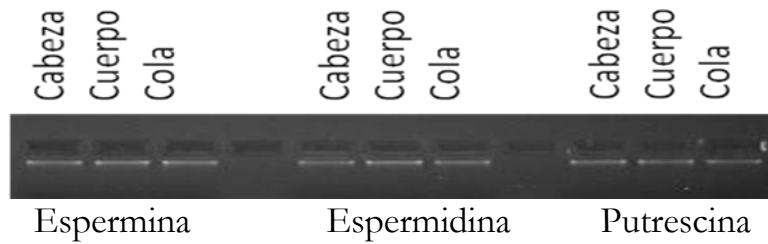


Figura 21. DNA de espermatozoides de borrego de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo incubado 30 días a 35 °C, con las poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM. **No se observó fragmentación.**

8.8. Aspectos comparativos de la electroforesis del DNA obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo en presencia de glucosa 5.5 mM y poliaminas.

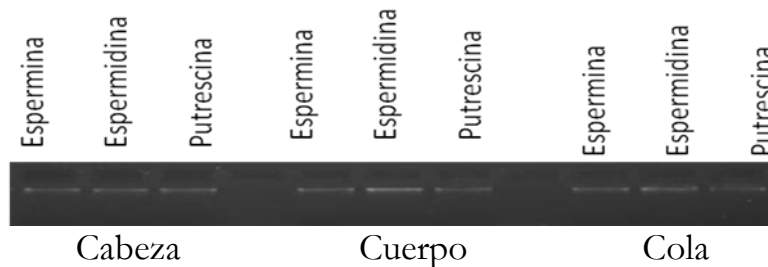


Figura 22. DNA de espermatozoides de borrego: cabeza, cuerpo y cola de epidídimo incubado a 35 °C, con glucosa 5.5 mM y las poliaminas: espermina, espermidina y putrescina 10 mM (30 días). **No se observó fragmentación.**

8.9. Aspectos comparativos de la electroforesis del DNA obtenido de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo en presencia de glucosa 30 mM y poliaminas.

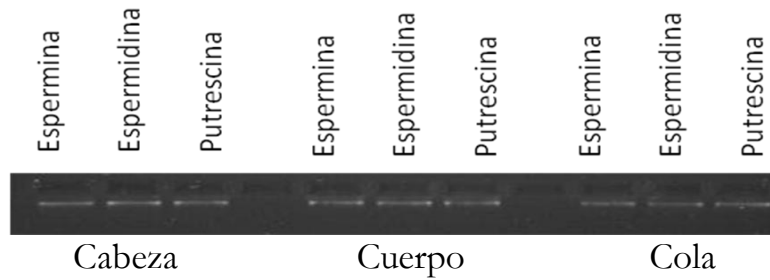


Figura 23. DNA de espermatozoides de borrego: cabeza, cuerpo y cola de epidídimo incubado 30 días a 35 °C, con glucosa 30 mM y con poliaminas: espermina, espermidina y putrescina 10 mM. **No se observó fragmentación.**

8.10. Aspectos comparativos de la electroforesis del DNA obtenido de espermatozoides de cola del epidídimo incubado con glucosa 5.5 mM y 30 mM y poliaminas por 180 días.

En la Figura 24 se observó fragmentación del DNA aislado de espermatozoides obtenidos de cola del epidídimo. El DNA fue incubado por 180 días a 35 °C con glucosa 5.5 mM y 30 mM y poliaminas: espermina, espermidina y putrescina 10 mM. Se observó que las poliaminas tienen un efecto protector contra la degradación del DNA. Este efecto es más notable para la espermina, seguido por la espermidina y menor grado por la putrescina.

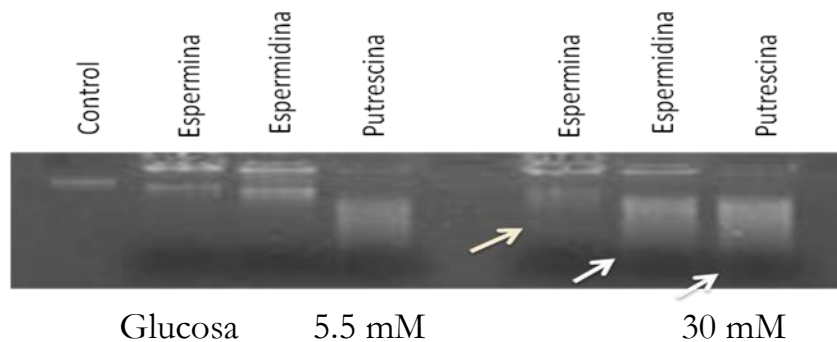


Figura 24. DNA de espermatozoides de borrego obtenido de cola de epidídimo incubado a 35°C, con glucosa 5.5 mM y 30 mM y con poliaminas: espermina, espermidina y putrescina 10 mM durante 180 días. El control es una muestra de DNA que no se trató con glucosa ni poliaminas.

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA.

8.11. Espectros de absorción a 260 nm del DNA obtenido de espermatozoides de diferente región del epidídimo recién aislado en condiciones basales y experimentales.

Los espectros de absorción, registrados en la región ultravioleta, del DNA aislado de espermatozoides de diferente región del epidídimo, que fue incubado con glucosa 5.5 mM y 30 mM en condiciones basales e incubado durante 30 días sin y con poliaminas se presentan en una serie de figuras que van desde la Figura 25 hasta la Figura 57. Se observan cambios importantes en los patrones espectroscópicos, específicamente a 260 nm en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Mientras que no se observaron cambios en el tiempo basal, a los 30 días de incubación se presentó un incremento en la absorbancia con glucosa 5.5 mM.

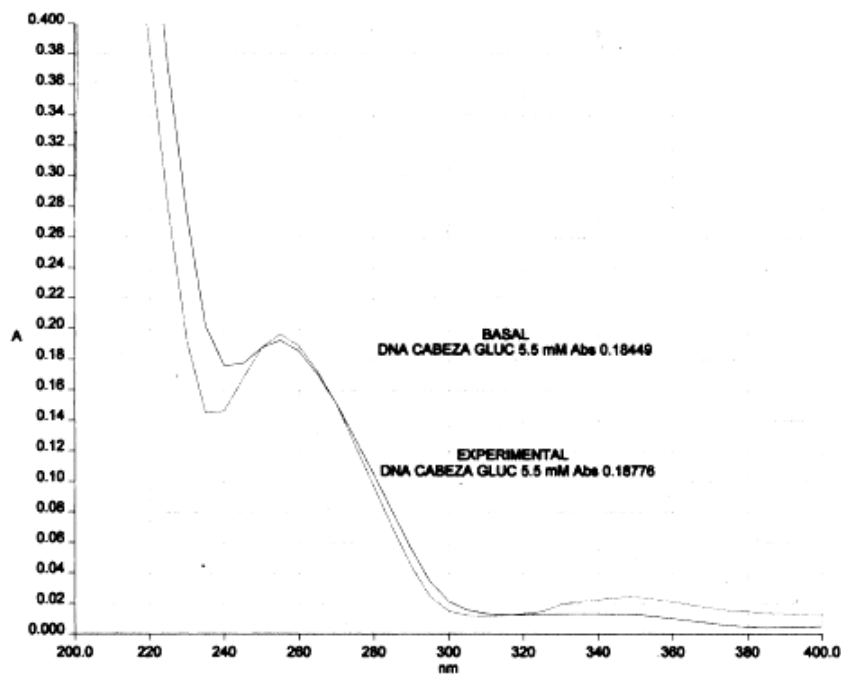


Figura 25. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + glucosa 5.5 mM Basal y Experimental.

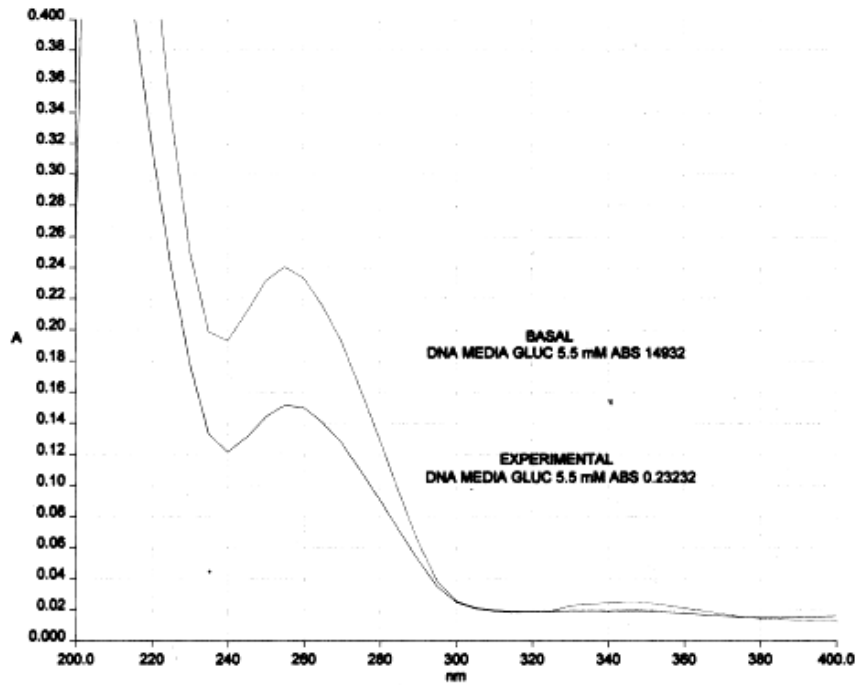


Figura 26. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + glucosa 5.5 mM Basal y Experimental.

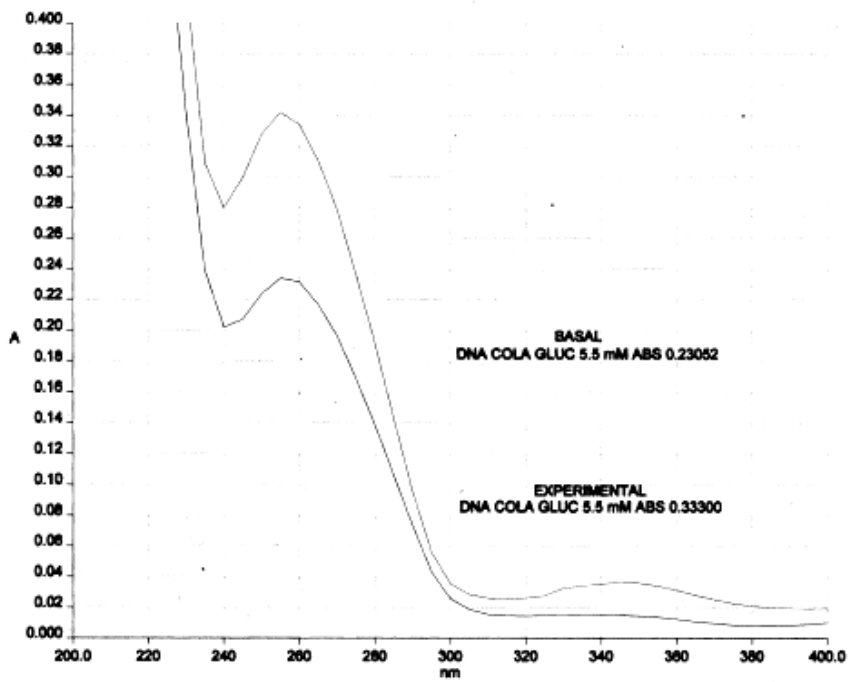


Figura 27. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo + glucosa 5.5 mM Basal y Experimental.

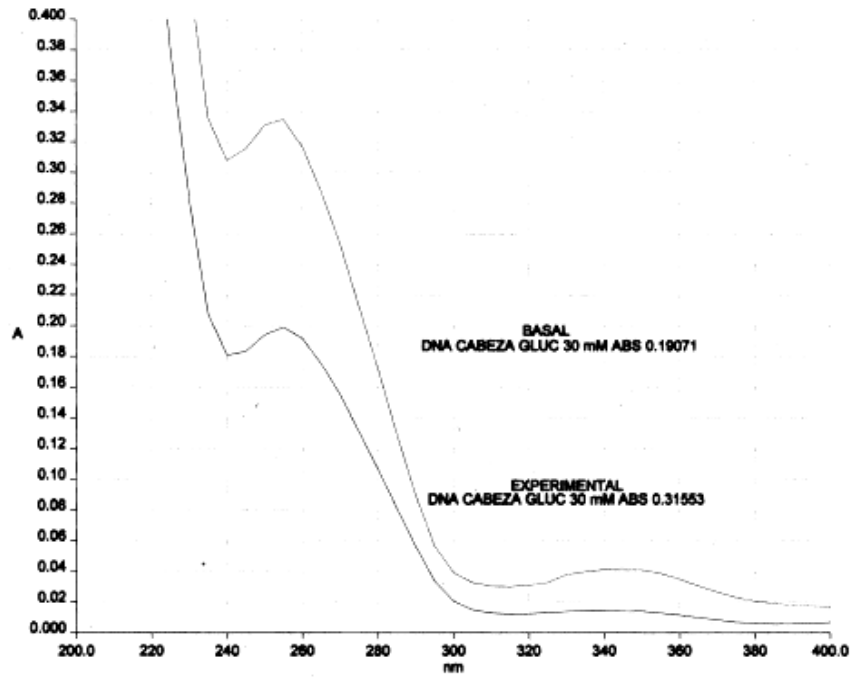


Figura 28. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + glucosa 30 mM Basal y Experimental.

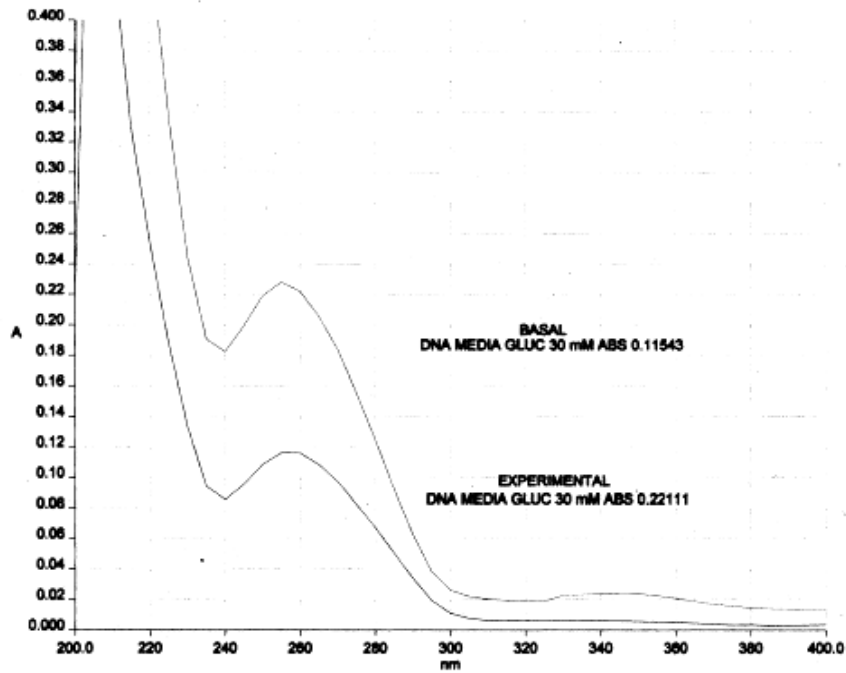


Figura 29. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + glucosa 30 mM Basal y Experimental.

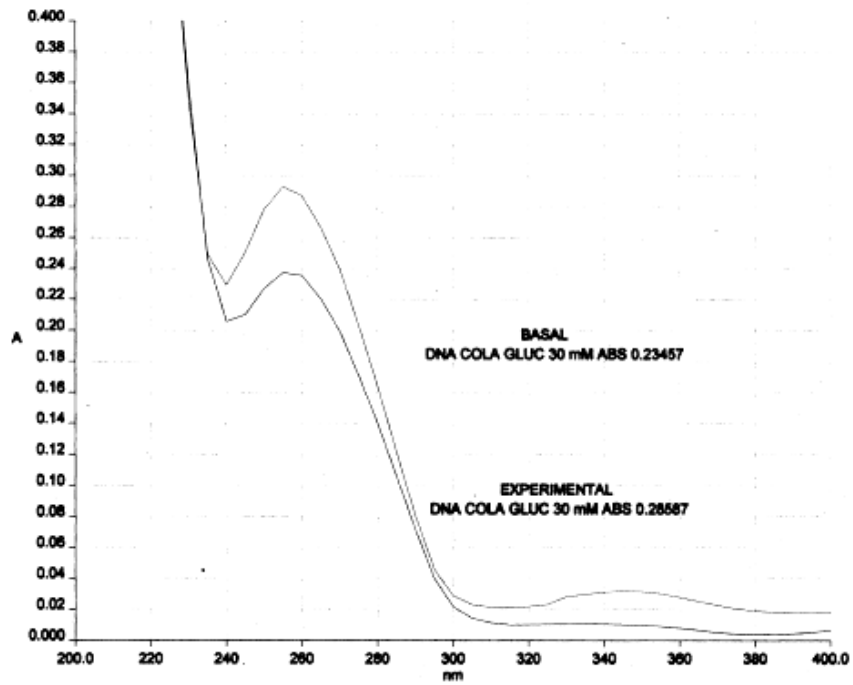


Figura 30. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo + glucosa 30 mM Basal y Experimental.

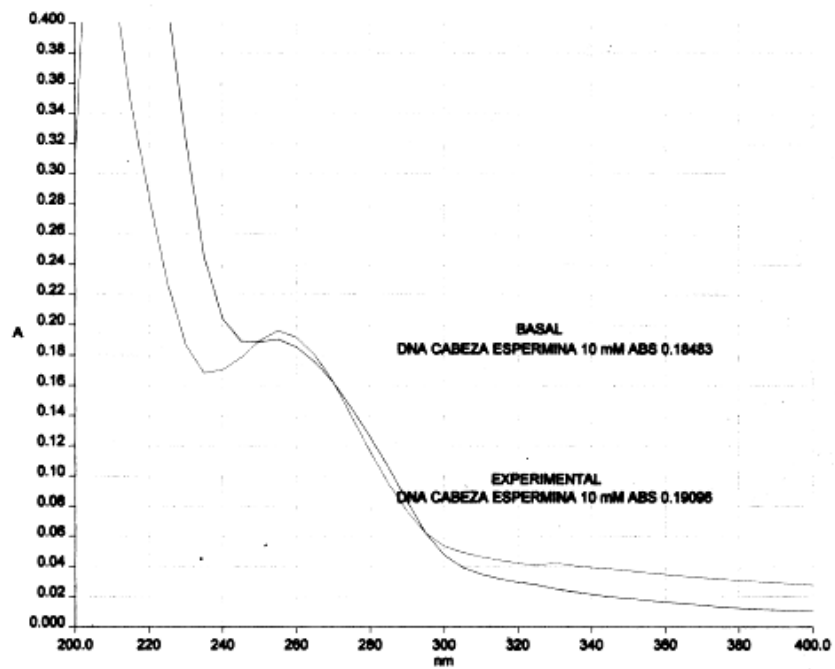


Figura 31. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + espermina 10 mM Basal y Experimental.

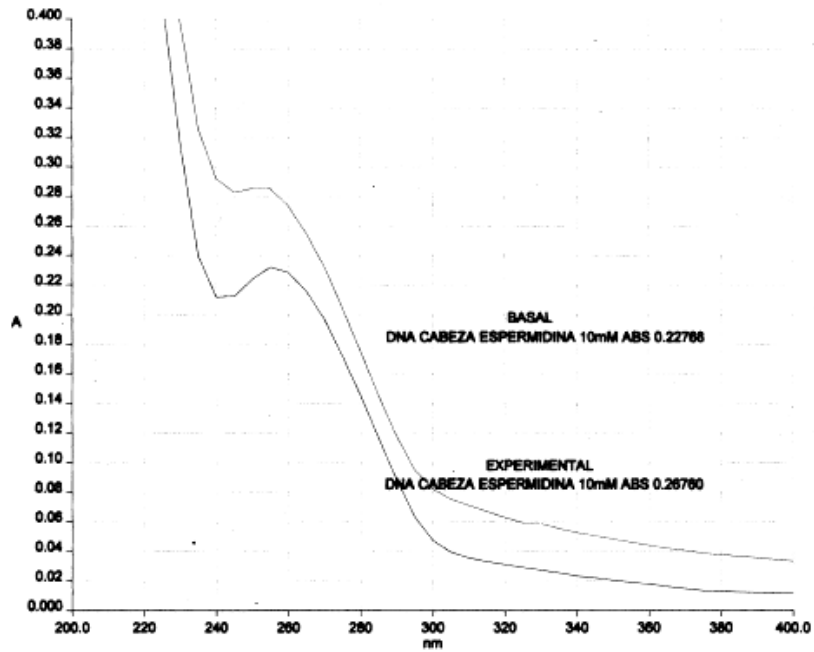


Figura 32. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + spermidina 10 mM Basal y Experimental.

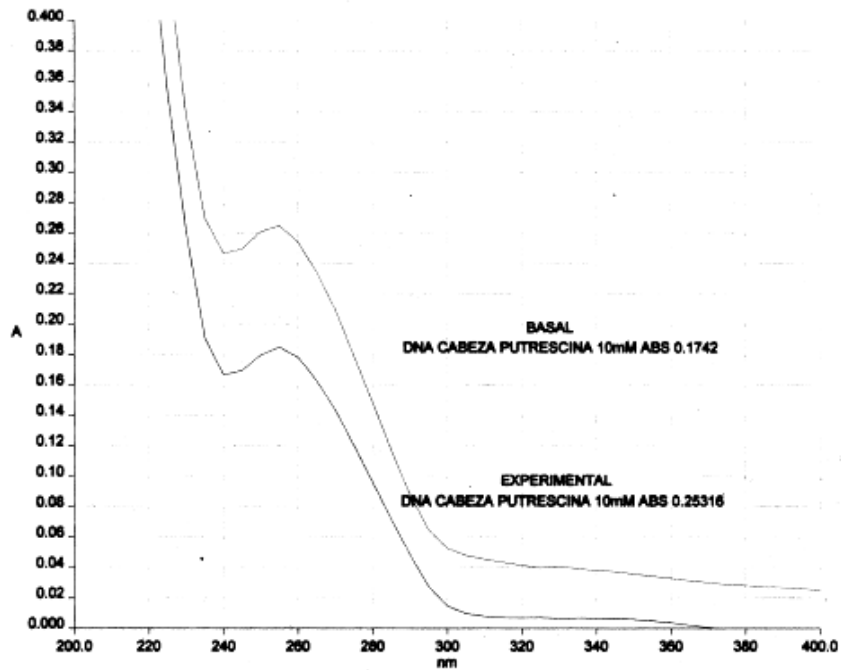


Figura 33. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + putrescina 10 mM Basal y Experimental.

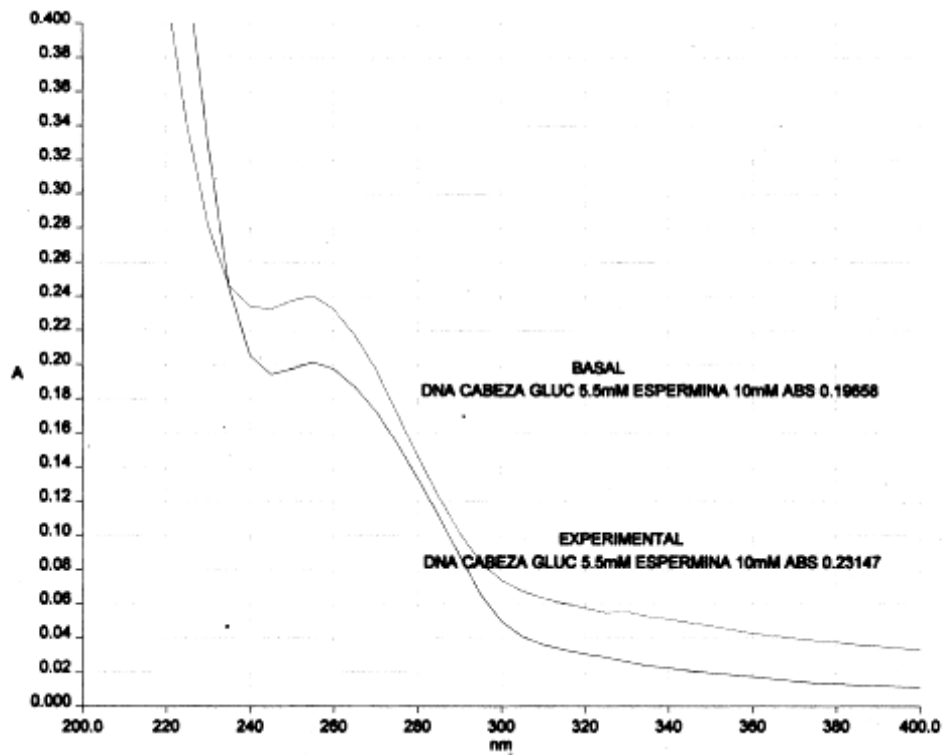


Figura 34. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + glucosa 5.5 mM + espermina 10 mM Basal y Experimental.

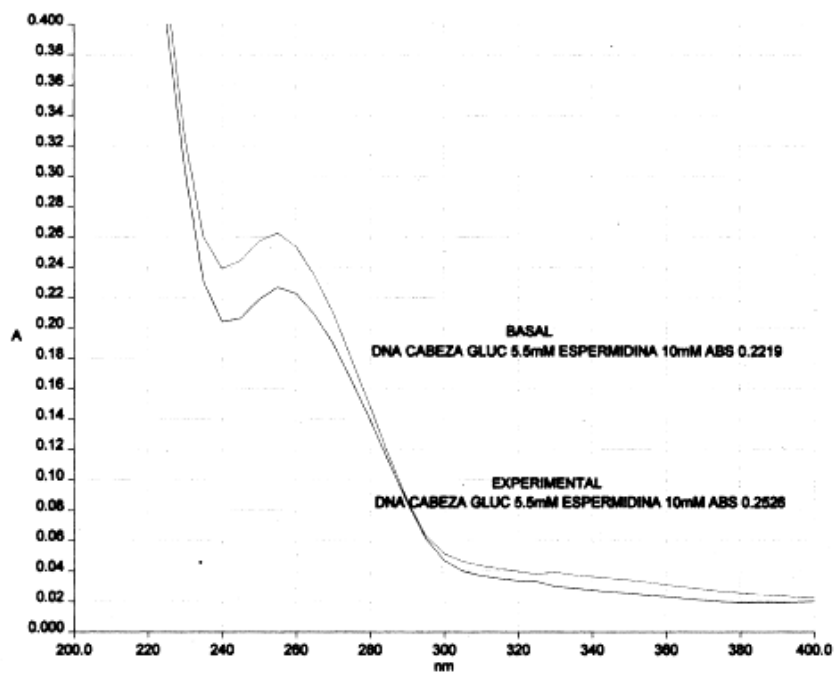


Figura 35. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + glucosa 5.5 mM + espermidina 10 mM Basal y Experimental.

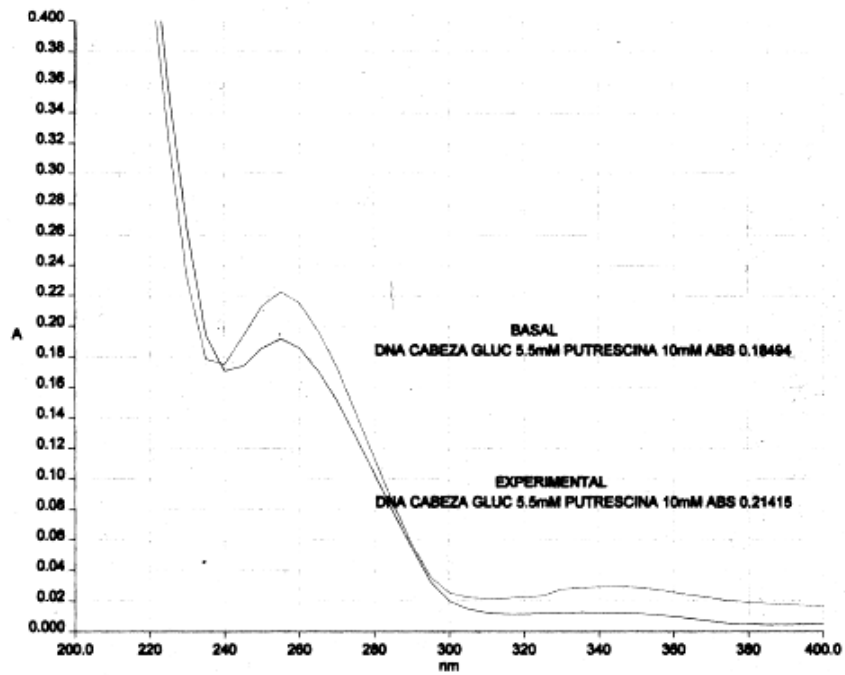


Figura 36. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + glucosa 5.5 mM + putrescina 10 mM Basal y Experimental.

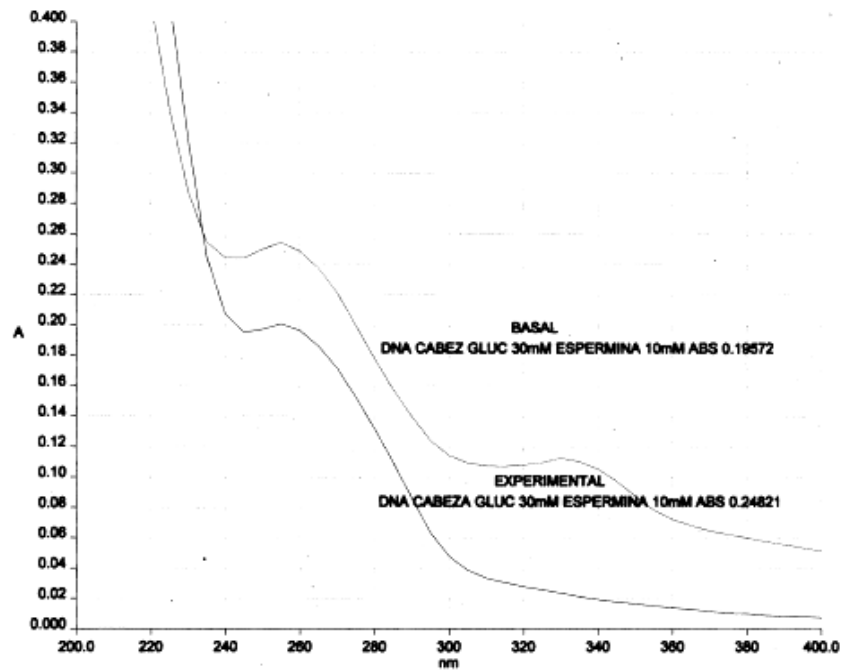


Figura 37. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + glucosa 30 mM + espermina 10 mM Basal y Experimental.

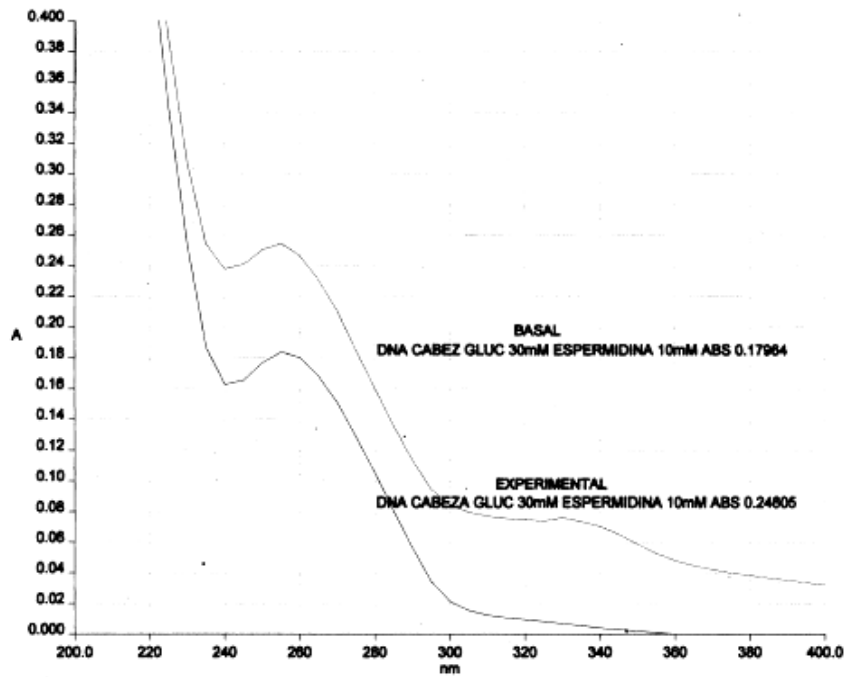


Figura 38. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + glucosa 30 mM + espermidina 10 mM Basal y Experimental.

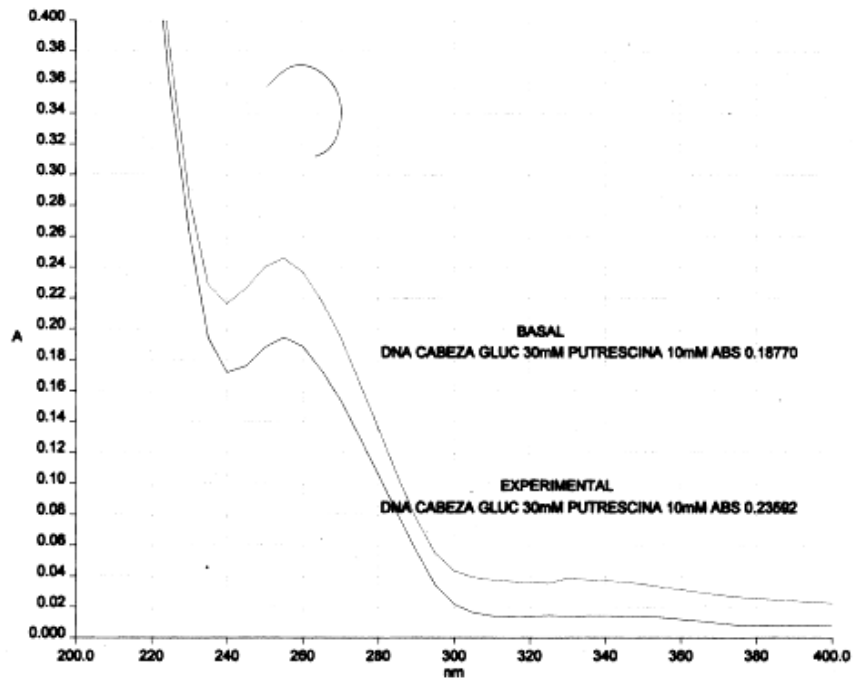


Figura 39. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cabeza del epidídimo + glucosa 30 mM + putrescina 10 mM Basal y Experimental.

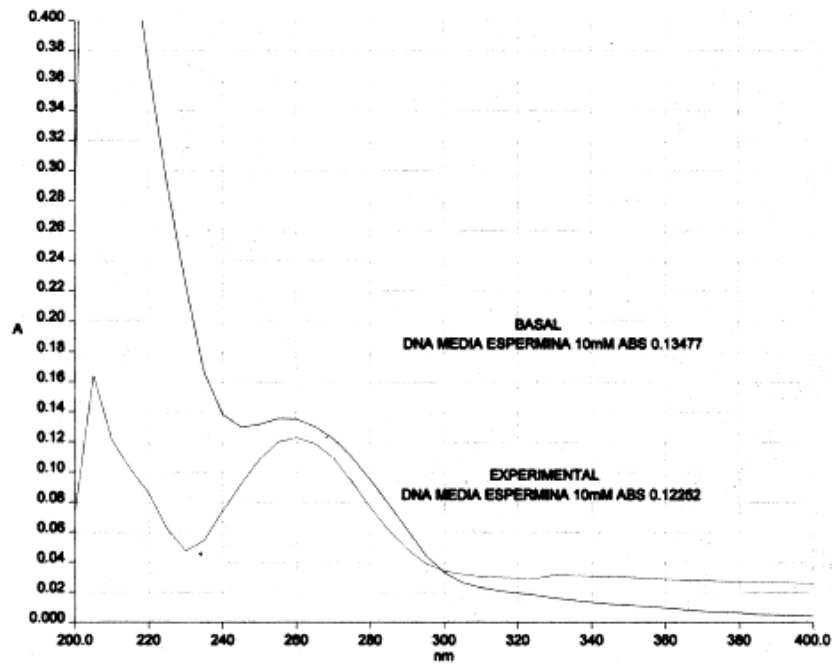


Figura 40. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + espermina 10 mM Basal y Experimental.

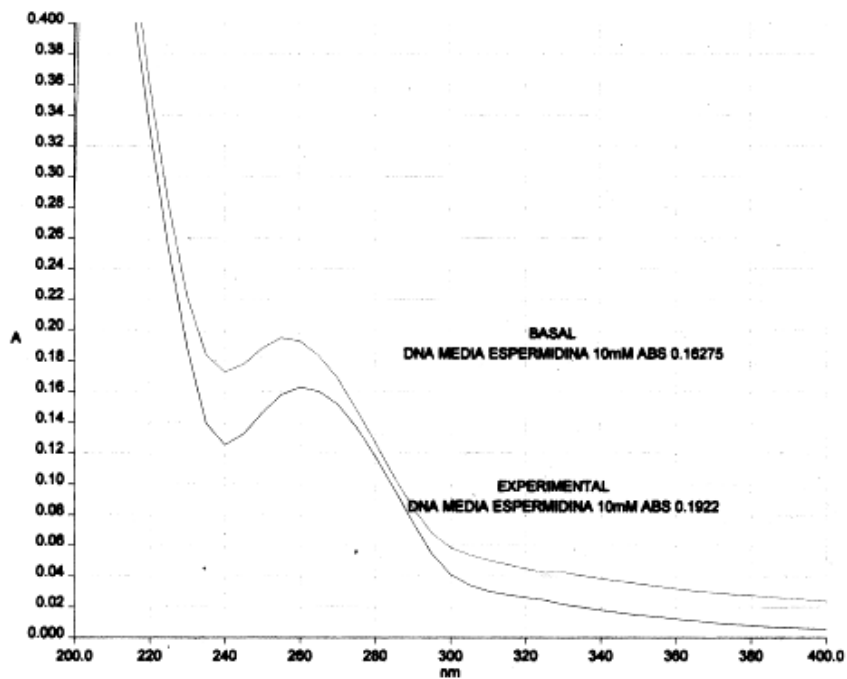


Figura 41. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + espermidina 10 mM Basal y Experimental.

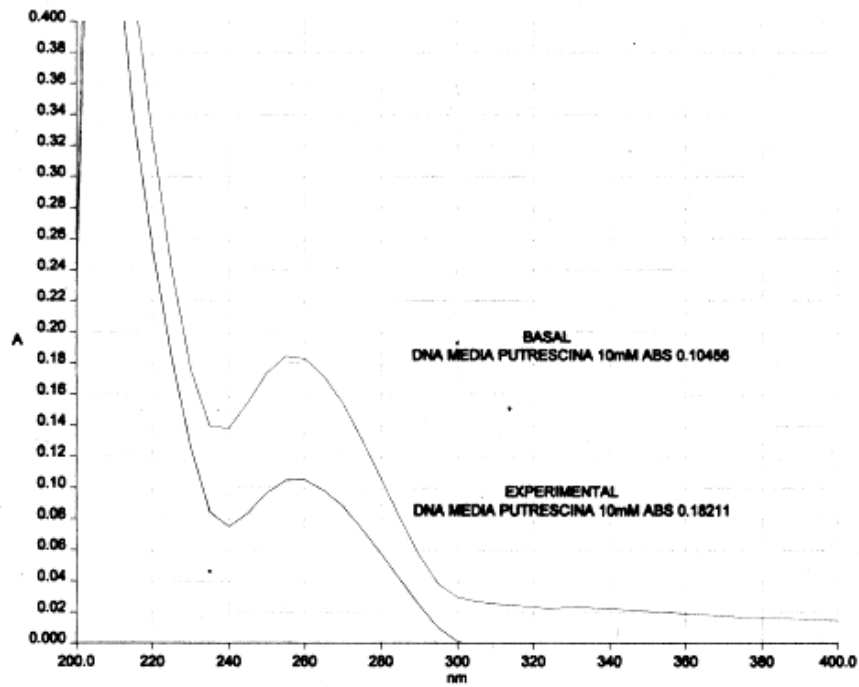


Figura 42. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + putrescina 10 mM Basal y Experimental.

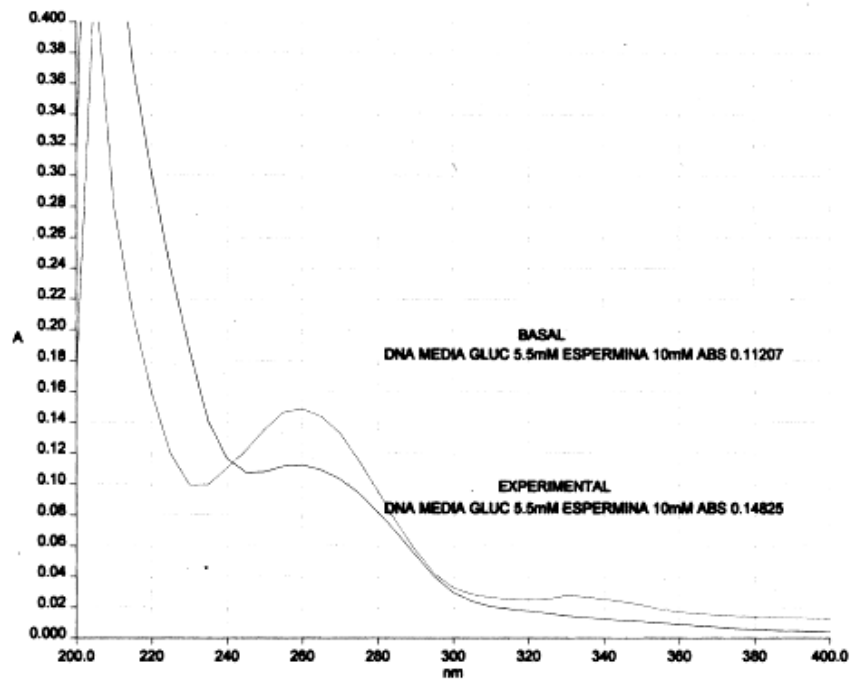


Figura 43. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + glucosa 5.5 mM + espermina 10 mM Basal y Experimental.

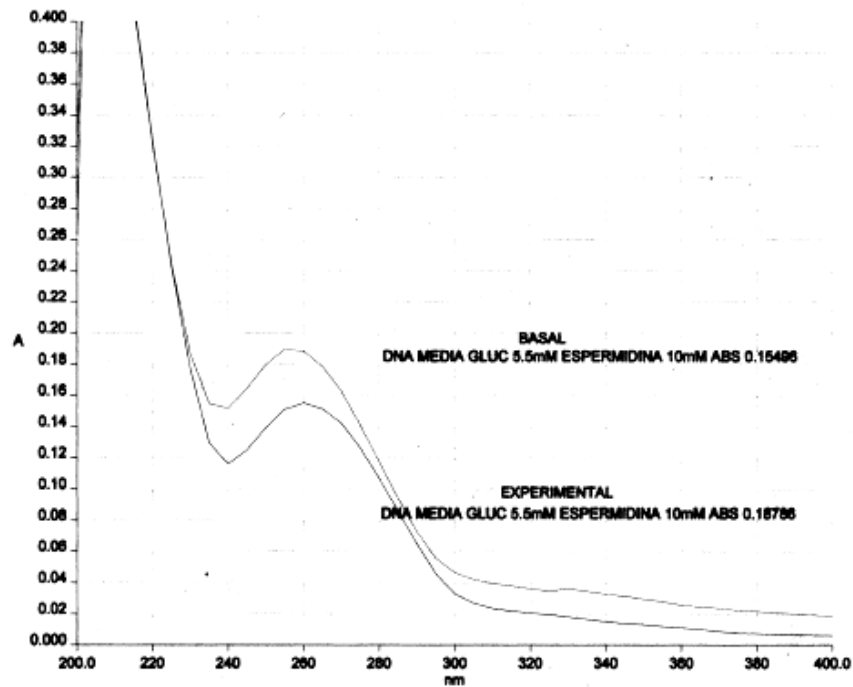


Figura 44. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + glucosa 5.5 mM + espermidina 10 mM Basal y Experimental.

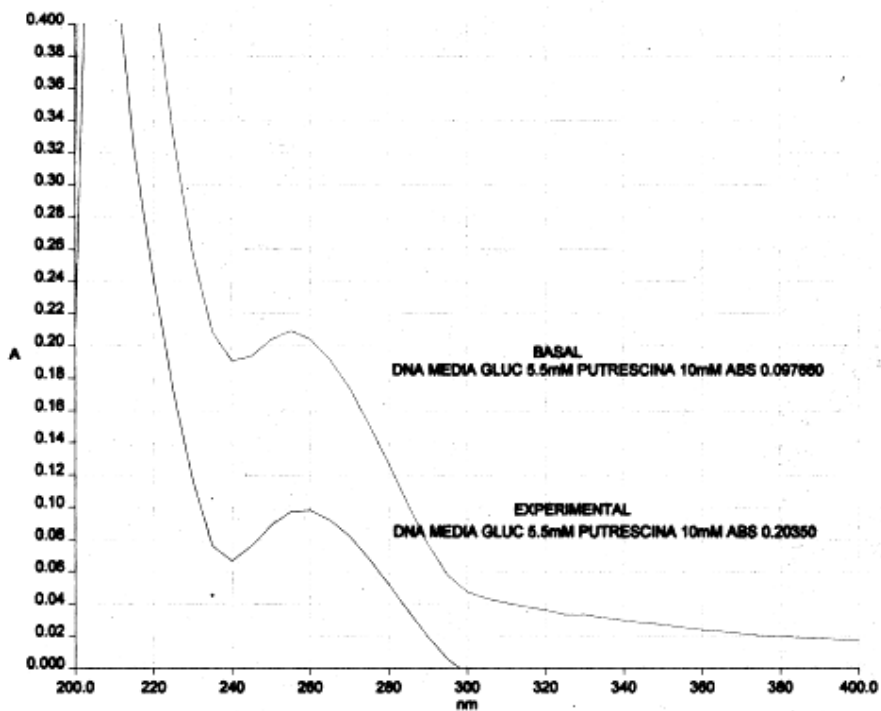


Figura 45. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + glucosa 5.5 mM + putrescina 10 mM Basal y Experimental.

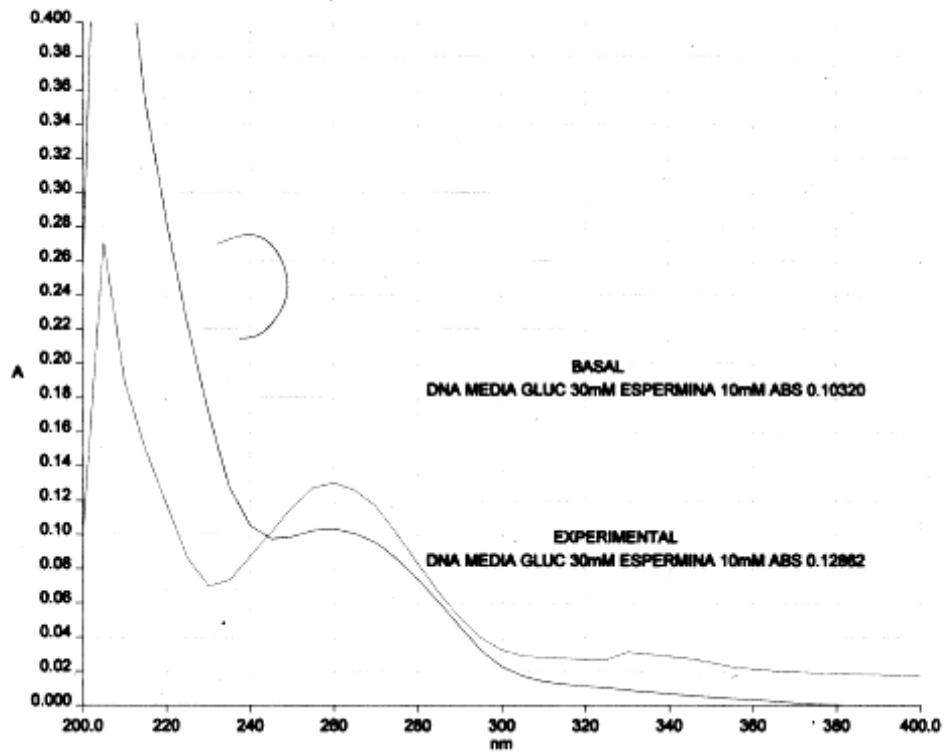


Figura 46. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + glucosa 30 mM + espermina 10 mM Basal y Experimental.

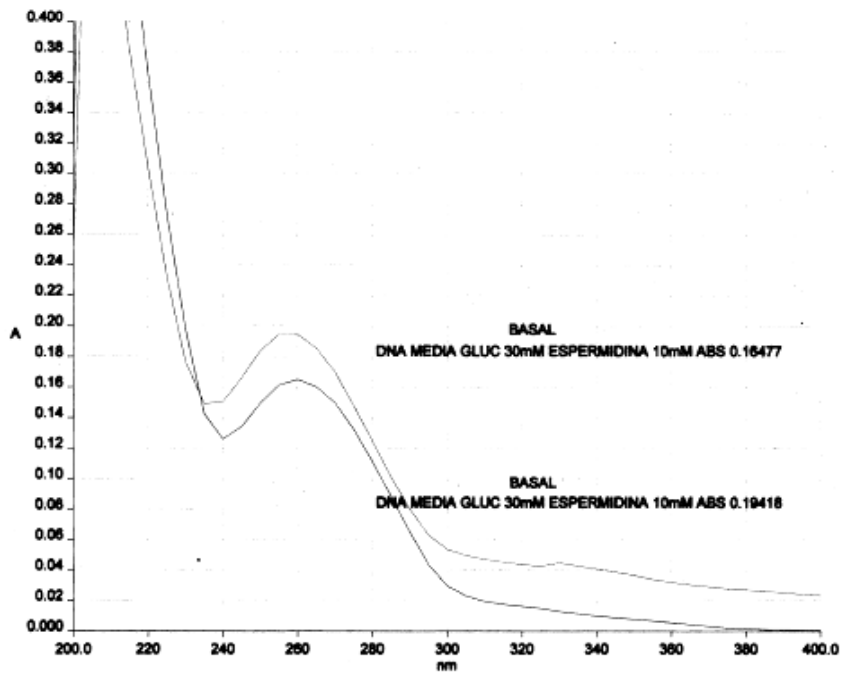


Figura 47. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + glucosa 30 mM + espermidina 10 mM Basal y Experimental.

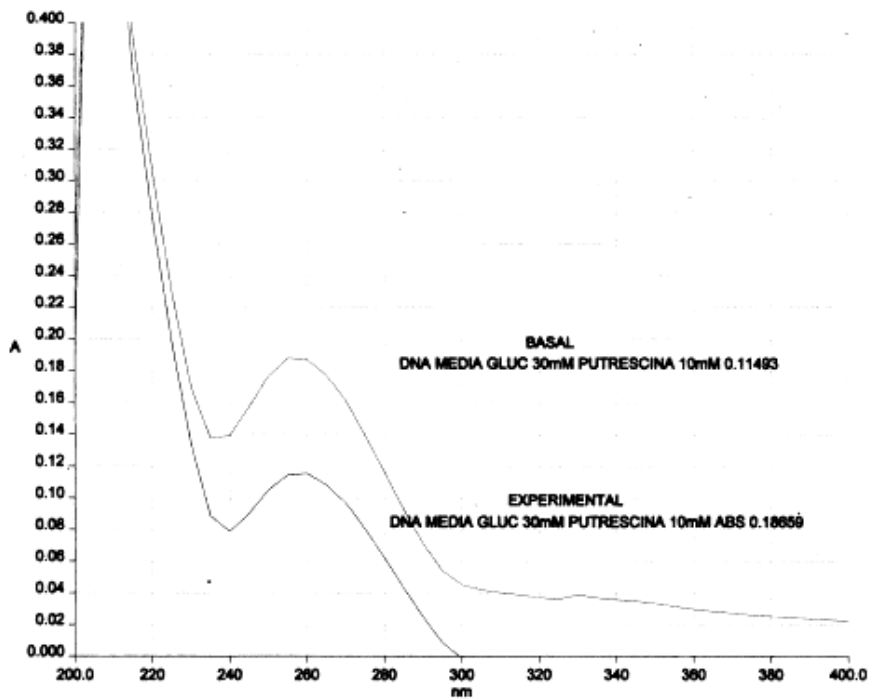


Figura 48. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos del cuerpo del epidídimo + glucosa 30 mM + putrescina 10 mM Basal y Experimental.

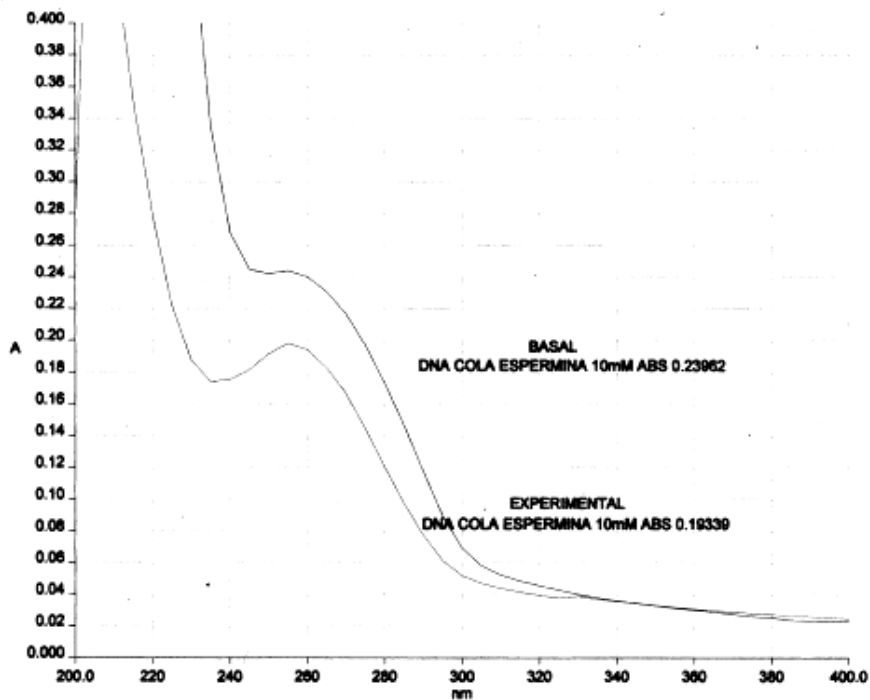


Figura 49. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo + espermina 10 mM Basal y Experimental.

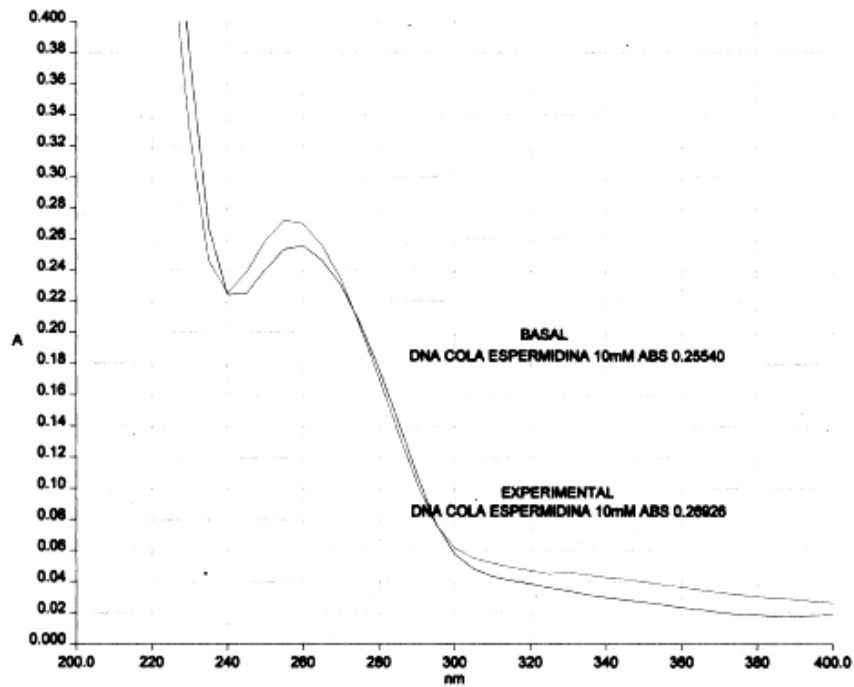


Figura 50. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo + espermidina 10 mM Basal y Experimental.

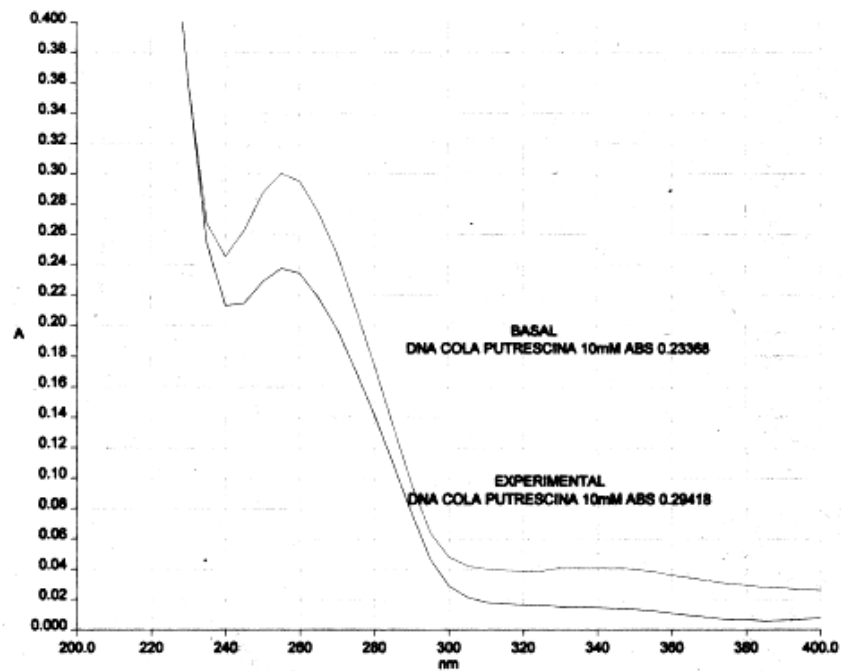


Figura 51. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo + putrescina 10 mM Basal y Experimental.

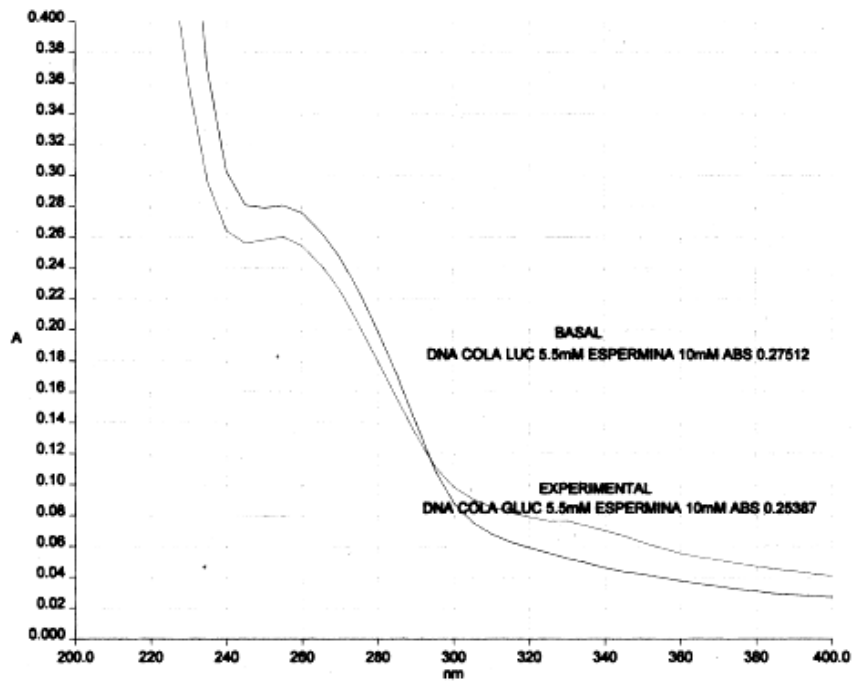


Figura 52. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo + glucosa 5.5 mM + espermina 10 mM Basal y Experimental.

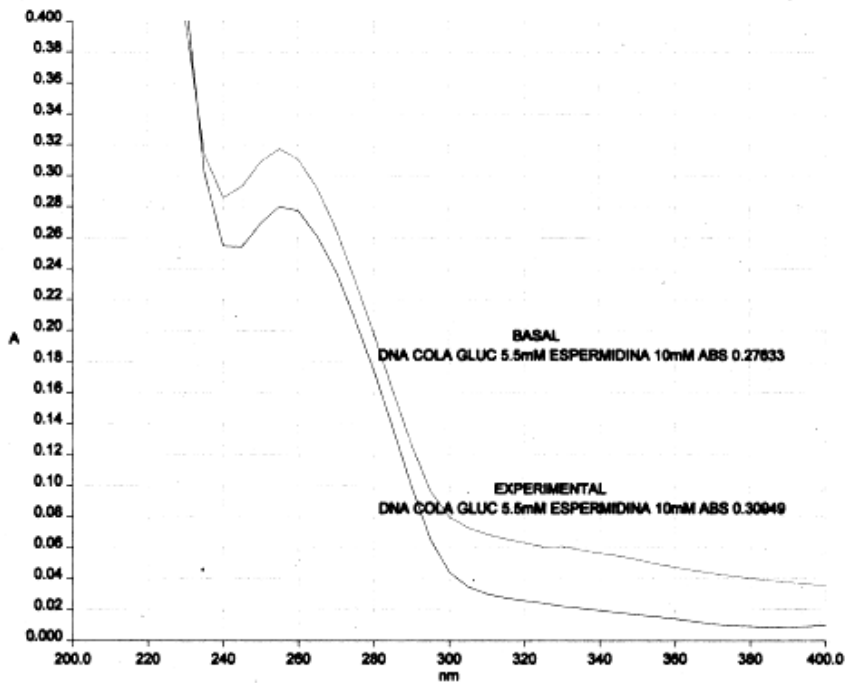


Figura 53. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo + glucosa 5.5 mM + espermidina 10 mM Basal y Experimental.

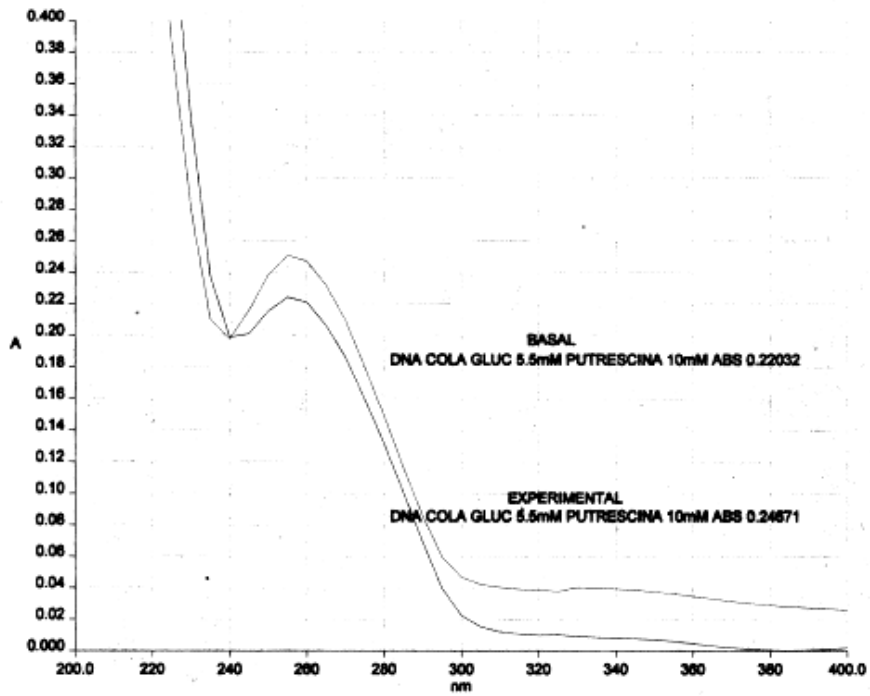


Figura 54. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo +glucosa 5.5 mM + putrescina 10 mM Basal y Experimental.

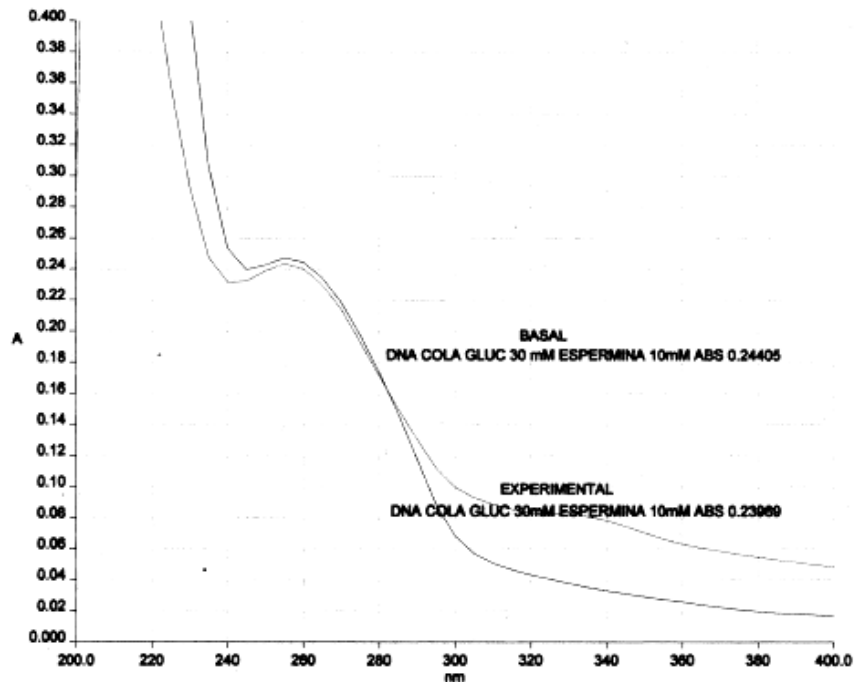


Figura 55. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo + glucosa 30 mM + espermina 10 mM Basal y Experimental.

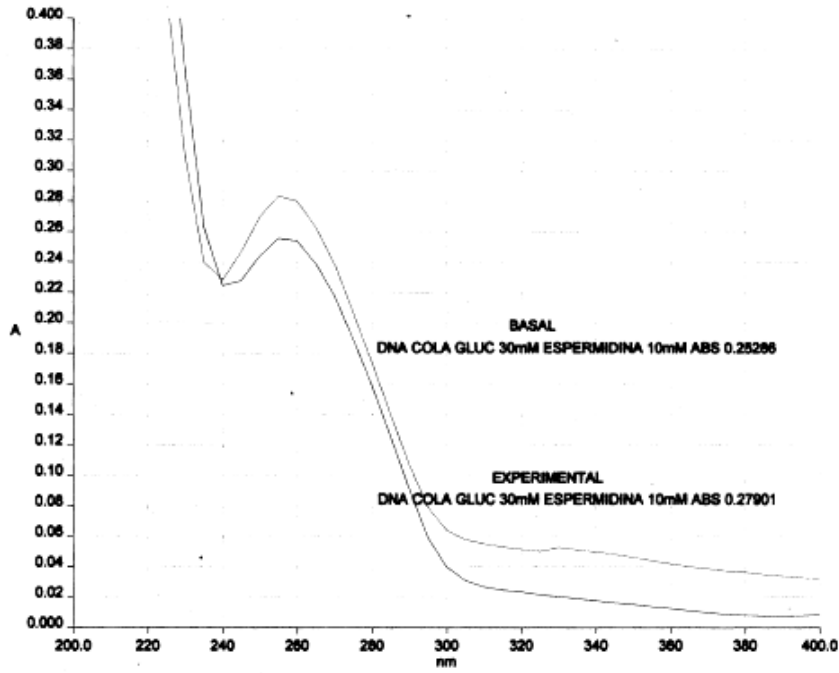


Figura 56. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo + glucosa 30 mM + espermidina 10 mM Basal y Experimental

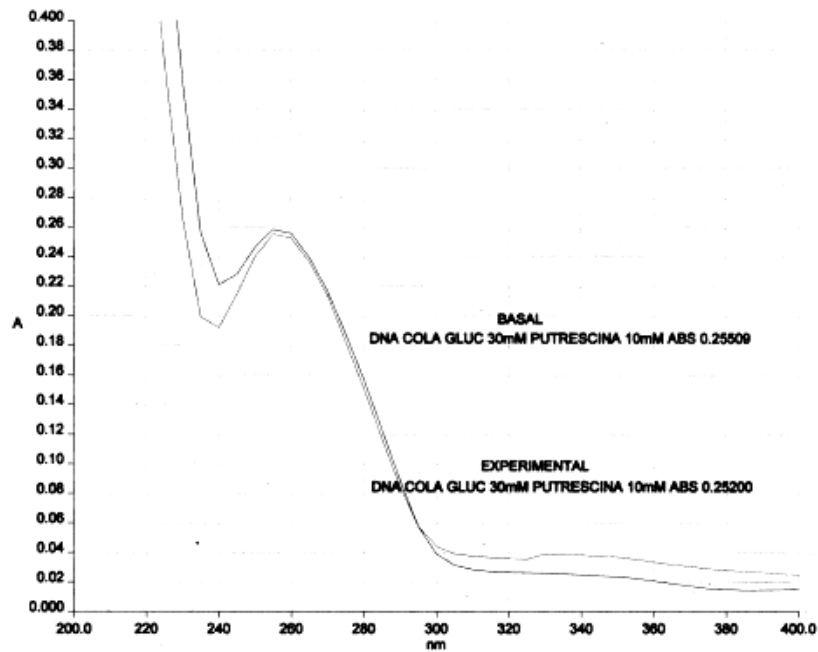


Figura 57. DNA de espermatozoides de borrego obtenidos de la cola del epidídimo + glucosa 30 mM + putrescina 10 mM Basal y Experimental.

8.12. Cambios observados en los patrones de absorción del DNA en las dos condiciones experimentales estudiadas.

De los espectros de absorción registrados en la región ultravioleta, del DNA aislado de espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo en condiciones basales y en condiciones experimentales a 30 días, se tomó la lectura de absorbancia a 260 nm y se presentan en los Tablas 4, 5, 6 y 7. De manera gráfica se presentan de la Figura 58 a la 61.

8.13. Efecto de la glucosa sobre la absorción del DNA a 260 nm.

Los cambios observados en los patrones espectroscópicos a 260 nm en las diferentes condiciones experimentales estudiadas son evidentes a los 30 días de incubación. La absorbancia aumentó con las dos concentraciones de glucosa utilizadas (Tabla 4, Figura 58).

Tabla 4. Valores de absorbancia, registrada a 260 nm, del DNA aislado de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, incubado con glucosa 5.5 y 30 mM en el tiempo basal (tiempo cero) y experimental (30 días).

Glucosa	5.5 mM Basal	5.5 mM Experimental	30 mM Basal	30 mM Experimental
Cabeza	0.18449	0.18776	<u>0.19071</u>	<u>0.31553</u>
Cuerpo	0.14932	0.23232	0.11543	0.22111
Cola	0.23052	0.33300	0.23457	0.28587

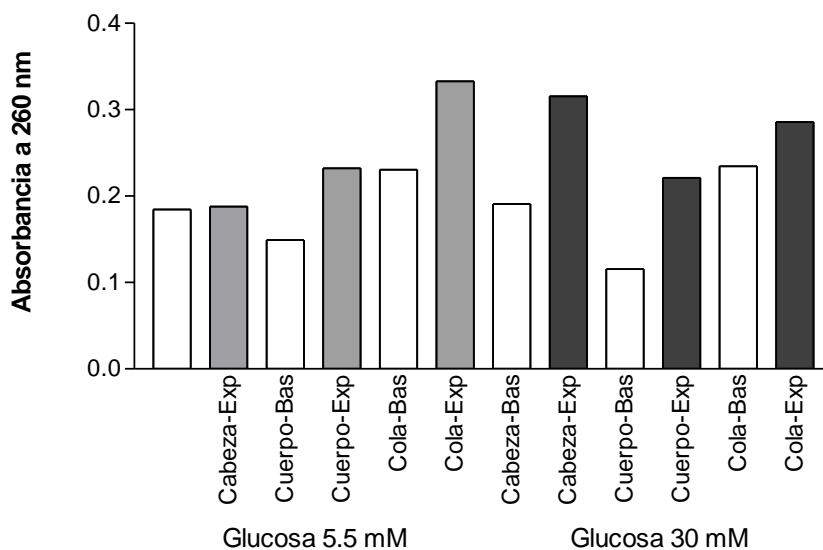


Figura 58. Grafica de barras que muestra el efecto de la glucosa sobre el DNA aislado de espermatozoides obtenidos de la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, incubados por 30 días a 35°C. La absorbancia fue registrada a 260 nm. El aumento en la absorbancia se da principalmente con el DNA de espermatozoides del cuerpo y cola de epidídimo más glucosa 5.5 mM. El aumento en la absorbancia se observó con el DNA de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo más glucosa 30 mM. Sin embargo, la absorbancia es evidentemente mayor en el DNA de cabeza del epidídimo a esta concentración.

8.14. Efecto de las poliaminas espermina, espermidina y putrescina sobre la absorción del DNA a 260 nm.

Absorbancia registrada a 260 nm del DNA aislado de los espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo, se incubó por 30 días con las poliaminas espermina, espermidina y putrescina. Se observó aumento de la absorbancia del DNA aislado de espermatozoides de cabeza de epidídimo incubado con espermina, espermidina y putrescina 10 mM. Por otro lado, disminuyó la absorbancia registrada a 260 nm del DNA aislado de espermatozoides de cuerpo y cola de epidídimo, incubado con espermina y aumentó la absorbancia del DNA con espermidina y putrescina 10 mM tanto en cuerpo como en cola de epidídimo (Tabla 5, Figura 59).

Tabla 5. Valores de absorbancia, registrada a 260 nm, del DNA aislado de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo con concentraciones de poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM en el tiempo basal (tiempo cero) y experimental (30 días).

Poliaminas sin Glucosa						
	Espermina Basal	Espermina Experimental	Espermidina Basal	Espermidina Experimental	Putrescina Basal	Putrescina Experimental
Cabeza	0.18483	0.19096	0.22766	0.26760	0.1742	0.25316
Cuerpo	<u>0.13477</u>	<u>0.12252</u>	0.16275	0.1922	0.10456	0.18211
Cola	<u>0.23962</u>	<u>0.19339</u>	0.25540	0.26926	0.23368	0.29418

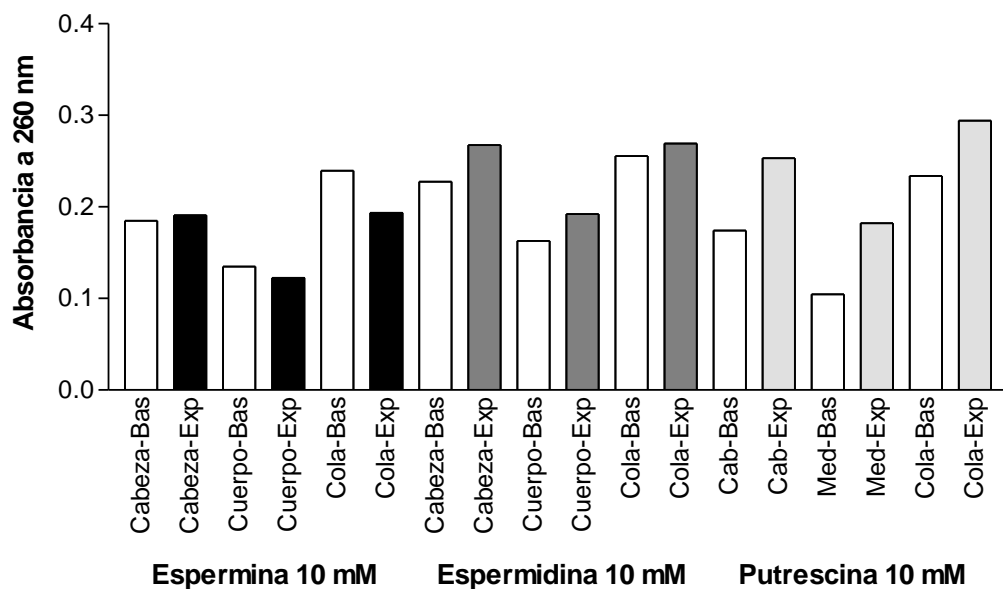


Figura 59. Grafica de barras que muestra los cambios en la absorbancia a 260 nm del DNA aislado de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, incubados por 30 días a 35 °C, con poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM. La absorbancia del DNA de espermatozoides de cuerpo y cola del epidídimo disminuyó cuando se utilizó espermina, pero aumentó la absorbancia del DNA de espermatozoides de la cabeza del epidídimo. La espermina, espermidina y la putrescina aumentaron la absorbancia en el DNA de espermatozoides de cuerpo y cola del epidídimo.

8.15. Efecto de la glucosa 5.5 mM y de las poliaminas sobre la absorción del DNA a 260 nm.

Absorbancia registrada a 260 nm del DNA aislado de los espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo, se incubó por 30 días con glucosa 5.5 mM y con las poliaminas espermina, espermidina y putrescina. Se observó aumento de la absorbancia del DNA aislado de espermatozoides de cabeza de epidídimo incubado con espermina, espermidina y putrescina 10 mM. Se observó aumento de la absorbancia del DNA aislado de espermatozoides de cuerpo de epidídimo incubado con espermina, espermidina y putrescina 10 mM. Se observó aumento de la absorbancia del DNA aislado de espermatozoides de cola de epidídimo incubado con espermidina y putrescina 10 mM y disminución de la absorbancia con espermina 10 mM (Tabla 6, Figura 60).

Tabla 6. Valores de absorbancia, registrada a 260 nm del DNA aislado de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo con concentraciones de glucosa 5.5 mM y de poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM en el tiempo basal (tiempo cero) y experimental (30 días).

Glucosa 5.5 mM						
	Espermina Basal	Espermina Experimental	Espermidina Basal	Espermidina Experimental	Putrescina Basal	Putrescina Experimental
Cabeza	0.19658	0.23147	0.2219	0.2526	0.18494	0.21415
Cuerpo	0.11207	0.14825	0.15496	0.18786	0.09766	0.2035
Cola	<u>0.27512</u>	<u>0.25387</u>	0.27633	0.30949	0.22032	0.24671

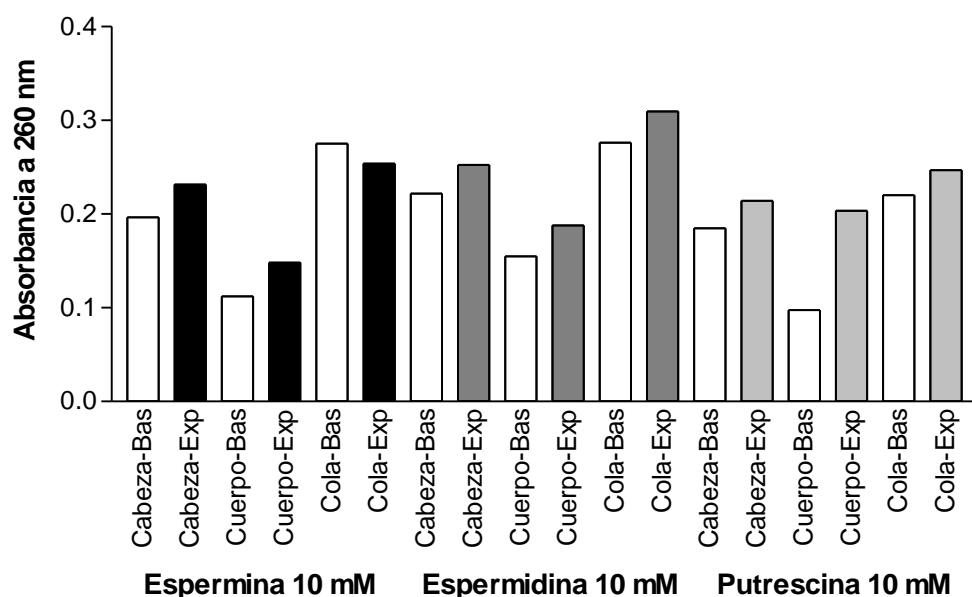


Figura 60. Grafica de barras que muestra los cambios en la absorbancia a 260 nm del DNA aislado de espermatozoides obtenidos de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, incubados por 30 días a 35 °C, con glucosa 5.5 mM y poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM.

8.16. Efecto de la glucosa 30 mM y de las poliaminas sobre la absorción del DNA a 260 nm.

Absorbancia registrada a 260 nm del DNA aislado de los espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo, se incubó por 30 días con glucosa 30 mM y con las poliaminas espermina, espermidina y putrescina. Se observó aumento de la absorbancia del DNA aislado de espermatozoides de

cabeza y cuerpo de epidídimo incubado con espermina, espermidina y putrescina 10 mM. Se observó aumento de la absorbancia del DNA aislado de espermatozoides de cola de epidídimo incubado con espermidina 10 mM y disminución de la absorbancia con espermina y putrescina 10 mM (Tabla 7, Figura 61).

Tabla 7. Valores de absorbancia, registrada a 260 nm, del DNA aislado de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo con glucosa 30 mM y concentraciones de poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM en el tiempo Basal (tiempo cero) y experimental (30 días).

Glucosa 30 mM						
	Espermina Basal	Espermina Experimental	Espermidina Basal	Espermidina Experimental	Putrescina Basal	Putrescina Experimental
Cabeza	0.19572	0.24821	0.17964	0.24605	0.18770	0.23592
Cuerpo	0.10320	0.12862	0.16477	0.19418	0.11493	0.18659
Cola	<u>0.24405</u>	<u>0.23969</u>	0.25266	0.27901	<u>0.25509</u>	<u>0.25200</u>

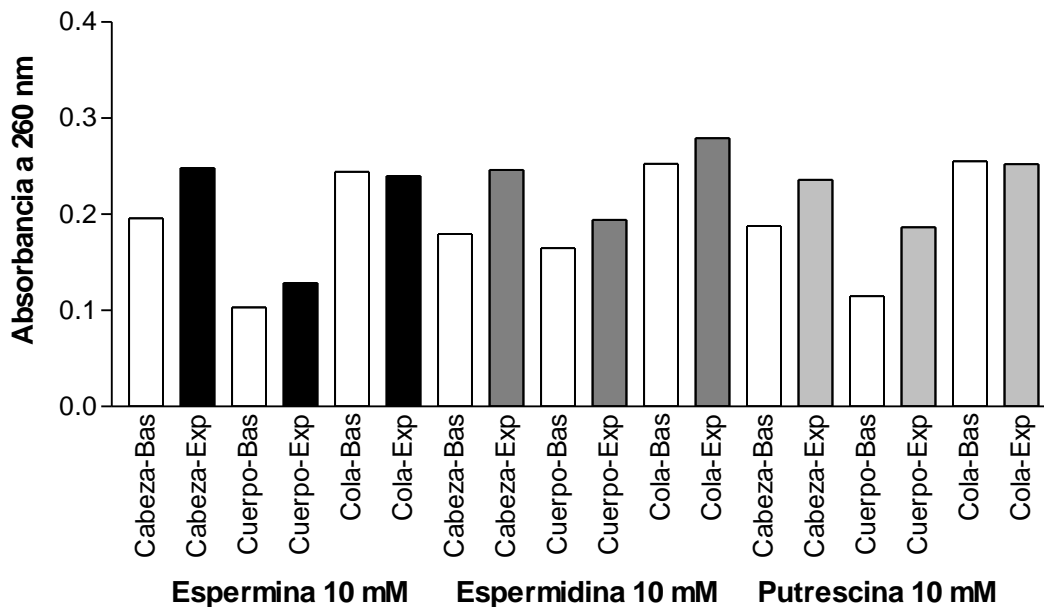


Figura 61. Grafica de barras que muestra los cambios en la absorbancia a 260 nm del DNA aislado de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, incubados con glucosa 30 mM y poliaminas espermina, espermidina y putrescina 10 mM por 30 días a 35 °C.

9. DISCUSIÓN.

La deficiencia absoluta o relativa de insulina afecta a un alto porcentaje de la población mundial. Aunque esta deficiencia es suplida por inyección o mejorada a través de la dieta o por el uso de hipoglucemiantes, estos tratamientos no previenen completamente el desarrollo de complicaciones crónicas que afectan los ojos, riñones, nervios y en general, el sistema circulatorio.

El acelerado deterioro de los grandes vasos por la diabetes, puede ser debido a un mecanismo patológico involucrando de manera sinérgica hiperlipidemias, cambios en plaquetas y pared arterial, entre otras anormalidades [108, 115]. El sistema reproductor no escapa a las consecuencias de la diabetes. Varias anormalidades reproductivas asociadas con este síndrome ocurren tanto en la mujer como en el hombre. En el varón las alteraciones más comunes en diabetes son la impotencia, que involucra la carencia o disminución de la libido, cambios en el coito y eyaculación retrógrada.

Entre los estudios llevados a cabo en hombres diabéticos sobresale el de Rubin y Babot [116], quienes en 1958, reportaron que el 55% de los pacientes diabéticos que estudiaron sufrieron de disfunción eréctil. Otros investigadores en 1963 [117] seleccionaron pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y los agruparon en dos grupos; aquellos que tenían por arriba de 9.3 años con diabetes e impotencia y el resto por arriba de 4.3 años de ser diabéticos pero sin impotencia. Los estudios de laboratorio del primer grupo de pacientes revelaron en el 60% excreción urinaria de gonadotropinas, y en algunos de ellos, las biopsias mostraron engrosamiento de la membrana basal de los túbulos seminíferos y espermatogénesis anormal. Este estudio concluyó que la impotencia y la infertilidad son debidas a hipogonadismo hipogonadotrópico.

El factor neurológico causante de problemas eréctiles en hombres diabéticos también ha sido estudiado [118]. Las pruebas hormonales y vasculares han mostrado que en la diabetes, la impotencia puede tener un origen neuropático urogenital. Desde el punto de vista de los parámetros endocrinos, se considera importante el aspecto endocrinológico de los pacientes diabéticos, para recuperar el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

En el paciente diabético, las gonadotropinas séricas no muestran un patrón constante. Los valores de la hormona luteinizante y de la hormona folículo-estimulante se han encontrado normales en algunos pacientes [119-121]; niveles disminuidos de LH [122], y también se ha reportado aumento en la relación

hormona luteinizante / hormona folículo-estimulante [123]. En pacientes diabéticos con impotencia orgánica primaria, los niveles de hormona folículo-estimulante y hormona luteinizante han sido elevados, pero no de manera significativa [124].

Hubo elevados niveles de prolactina en pacientes con diabetes de larga evolución [125].

La testosterona muestra un patrón diferente si es medida como testosterona total o testosterona libre. La testosterona total disminuyó en pacientes con diabetes por periodos largos de tiempo, mientras que aquellos con una duración de 6 a 9 años tuvieron valores elevados. Sin embargo, la testosterona libre esta disminuida en todos los pacientes diabéticos, independientemente de la duración de la enfermedad. La baja concentración de testosterona en el suero de pacientes diabéticos es un indicador de cambios en el metabolismo de andrógenos testiculares. La disminución sérica de testosterona o en los tejidos testiculares es debida a un número disminuido de células de Leydig, que resulta del efecto deletéreo de la diabetes mellitus.

De acuerdo al grado de la lesión, el epitelio seminífero fue reducido a nivel de espermátide. La pared mostró fibrosis periférica y hialinización. Los cambios en la función de las células de Sertoli, seguidos por cambios en las células germinales del epitelio son, también, resultado de menor síntesis de testosterona en los pacientes diabéticos. En adición, los cambios en la síntesis de andrógenos y la deficiencia de la síntesis de testosterona, reflejan alteraciones en la espermatogénesis y la secreción por la próstata y las glándulas sexuales accesorias en hombres diabéticos, seguido por una inadecuada morfología, maduración y movilidad espermática.

Las características del semen son los parámetros más importantes de la función de las gónadas y de las glándulas accesorias. A este respecto, varios estudios han sido llevados a cabo sobre la calidad del semen en hombres diabéticos [126-129]. Entre los hallazgos más relevantes son la pobre calidad del eyaculado [130, 131], movilidad disminuida del espermatozoide hasta en 50% [132, 133], aumento en el tamaño del flagelo espermático [134] y disminución en el volumen del fluido seminal, por arriba del 39 % en pacientes con neuropatía diabética [135].

Aunque la patogénesis de la diabetes en el testículo humano es desconocida, se ha sugerido que la función de las células de Leydig y de Sertoli es mantenida por la insulina [136]. Esta hormona promueve la secreción de la proteína transportadora de andrógenos y transferrina en las células de Sertoli de rata aisladas y mantenidas

en cultivo [137]. La función de estas células es anormal en animales diabéticos y algunos experimentos han revelado un efecto estimulante por insulina sobre la esteroidogénesis y la síntesis de testosterona [138]. La presencia de receptores de insulina en las células de Leydig ha sido demostrada, así como su disminución en animales diabéticos [139, 140].

Poco se sabe de la acción de insulina sobre la movilidad espermática y el metabolismo. La concentración de insulina seminal es 2.4 veces más alta que en la sangre [127, 141]. No hay diferencias importantes en la insulina sanguínea y en plasma seminal en hombres normospermicos, oligozoospermicos [142] y azoospermicos [143]. Por lo tanto, se ha propuesto que la determinación de la hormona en este fluido biológico no puede ser usada como indicador de la calidad y capacidad fertilizante del semen. Todo esto parece indicar que la insulina juega un papel importante en la regulación de la fertilidad masculina.

Por otro lado, es bien conocido que en la liberación de insulina están involucradas varias moléculas, entre ellas la glucosa [144], L-arginina y las poliaminas [145]. La putrescina es el precursor en la síntesis de espermina y espermidina. Su formación es catalizada por la ornitina descarboxilasa, cuya actividad fue previamente demostrada en espermatozoides de rata [146] y en espermatozoides humanos eyaculados [147].

La arginasa es la enzima que provee de ornitina para la formación de putrescina en tejidos extrahepáticos [148]. La actividad de esta enzima ha sido demostrada en espermatozoides, tanto eyaculados como obtenidos del epidídimo de borrego [149].

La actividad de la arginasa es mayor en los espermatozoides de la cabeza del epidídimo, comparada con la de espermatozoides de las otras regiones del epidídimo, incluyendo las del eyaculado. La presencia de esta enzima se asocia con la síntesis de poliaminas, moléculas que han sido relacionadas con la regulación de la movilidad espermática, pero que también se asocian con la estabilización del DNA, contribuyendo con las histonas y las protaminas, ambas proteínas ricas en arginina, a su estructuración y compactación. Las histonas contienen hasta 80-85% de arginina y participan en la formación de nucleosomas, permitiendo una relación de empaquetamiento de 8000:1 para el espermatozoide humano, mientras que las protaminas contienen 36% de arginina y consecuentemente también se relacionan con la estructuración de la cromatina, al tener propiedades policatiónicas.

Aunque los grupos amino primarios de los nucleótidos son químicamente menos reactivos hacia los carbohidratos reductores que el grupo amino de la lisina en las proteínas. Se ha observado glicación de las bases nitrogenadas que constituyen a los ácidos nucleicos la cual provoca anomalías en el patrón del DNA [150]. Por otro lado, las propiedades espectroscópicas de los derivados de los productos finales de glicación avanzada-DNA (AGEs-DNA), son similares a las observadas en las proteínas glicadas. La información que existe sobre los efectos de la glicación de los ácidos nucleicos, específicamente en el DNA, proviene de estudios de transfección de material genético viral a *Escherichia coli*, en los que se ha visto una pérdida potencial de transfección atribuida a la glicación del DNA.

Por su larga vida media, se piensa que *in vivo* el DNA podría acumular de manera progresiva productos de glicación, específicamente AGEs. Tal acumulación podría ser responsable de los cambios dependientes de la edad en el material genético, que incluyen aberraciones cromosómicas, ruptura de cadenas del DNA y una declinación de los procesos de reparación, replicación y transcripción [151]. En condiciones de hiperglucemia estos procesos pueden acelerarse y dar como resultado un “envejecimiento celular” temprano.

La glicación de los ácidos nucleicos puede ser responsable del aumento en la frecuencia de anomalías congénitas, en hijos de madres diabéticas. La exposición del embrión a altas concentraciones de glucosa podría conducir a una mayor reacción de la glucosa con el DNA, en etapas críticas del desarrollo, que causaría ruptura cromosómica y mutagénesis. Sin embargo, aunque las malformaciones congénitas son 2 a 3 veces más frecuentes en infantes de madres con diabetes, todavía no se propone un mecanismo que explique este hecho [152].

En este estudio llevado a cabo a dos tiempos diferentes, considerados uno de corta exposición (30 días) y otro de larga exposición (180 días) del DNA a glucosa, en una concentración fisiológica y una simulando hiperglucemia, se observaron cambios importantes tanto por análisis del DNA en la región ultravioleta (30 días), como por electroforesis en gel de agarosa (180 días).

Cuando la incubación del DNA se llevó a cabo por 30 días con dos concentraciones de glucosa (5.5 mM y 30 mM) en presencia de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina (10 mM), no se observó fragmentación del DNA; sin embargo, cuando la incubación se llevó a cabo por 180 días la fragmentación del DNA fue evidente (Figura 24). El grado de fragmentación del DNA espermático varió, dependiendo de la región epididimaria de donde fueron obtenidos los espermatozoides. El DNA aislado de espermatozoides de cola de

epidídimo con glucosa 30 mM, fue más sensible a la degradación aún en presencia de las poliaminas.

La degradación del DNA, vista por electroforesis en gel de agarosa, reveló que el efecto de la glucosa fue mayor con glucosa 30 mM, que simuló las condiciones de hiperglucemia, pero la degradación del DNA también se observó, aunque en menor grado, con glucosa 5.5 mM, aún en presencia de las poliaminas. Por lo que se puede concluir que las poliaminas espermina y espermidina protegen al DNA espermático y que aún cuando el DNA se degrada en condiciones de hiperglucemia, si hay un efecto protector de las poliaminas y que este efecto es mayor para la espermina, seguida de la espermidina y en menor grado por la putrescina. Este efecto podría ser debido a la presencia de cuatro grupos amino en la espermina. Este hallazgo podría también indicar que la actividad antiglicante depende del número de grupos amino, ya que durante la glicación ocurre una competencia con los grupos amino libres de las bases nitrogenadas. Se ha propuesto que las poliaminas son capaces de formar bases de Schiff con los grupos carbonilo de azúcares de cadena abierta, fragmentos dicarbonilo, productos de Amadori o con intermediarios post-Amadori, inhibiendo así la formación de productos finales de glicación avanzada, como ha sido demostrado en la formación *in vitro* de la pirralina [153]. La formación de algún compuesto de estructura cíclica con residuos de lisina o arginina de proteínas que permanecen fuertemente unidas al DNA y que contribuirían al aumento en la absorbancia, observada a 260 nm, puede ser posible, sin embargo; este aspecto no fue investigado.

Por otro lado, se ha informado que durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo se puede producir fragmentación del DNA espermático. Uno de los mecanismos principales es el relacionado con la producción de radicales libres, ya sea por espermatozoides inmaduros o por las células epiteliales del epidídimo, que dañan directamente el material genético del espermatozoide. Además, la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas, por factores tóxicos y temperaturas elevadas, también puede inducir fragmentación del DNA.

Numerosos autores han demostrado que el estrés oxidativo, juega un papel preponderante en la etiología de la infertilidad masculina [154]. La producción elevada de especies reactivas del oxígeno se asocia a una pérdida de la función espermática, a través de mecanismos que incluyen lipoperoxidación de membranas, alteraciones del metabolismo, movilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides [155, 156]. Se ha demostrado que el estrés oxidativo afecta directamente la integridad genómica de los espermatozoides, induciendo

entrecruzamiento de la cromatina, oxidación de bases nitrogenadas y ruptura de las cadenas polinucleotídicas del DNA [157].

Se ha propuesto que las poliaminas espermina y espermidina, en concentraciones milimolares, son “apagadores” físicos del singulete de oxígeno molecular ($^1\text{O}_2$), y protegen al DNA del ataque de este radical que afecta específicamente residuos de guanina durante el proceso de replicación en *Escherichia coli* [158]. A este respecto podemos hipotetizar que en este estudio, las poliaminas protegieron al DNA del efecto de los radicales libres, generados por la posible auto-oxidación de glucosa, cuando el DNA fue incubado por 180 días en condiciones de hiperglucemia, ya que existen reportes en la literatura que sugieren que la espermina es el principal compuesto intracelular capaz de proteger al DNA del ataque de los radicales libres [159].

Finalmente, consideramos que los resultados de este estudio contribuyen al entendimiento del papel que las poliaminas espermina, espermidina y putrescina juegan en la fisiología reproductiva en condiciones normales y cómo estas pequeñas moléculas pueden contribuir a prevenir el daño al DNA espermático en condiciones de hiperglucemia.

10. CONCLUSIONES.

De este estudio se concluye que cuando el DNA espermático fue expuesto, tanto a la concentración fisiológica de glucosa equivalente a 5.5 mM, como a la concentración de glucosa 30 mM por un periodo de 30 días, presentó cambios en sus propiedades espectroscópicas a 260 nm, sin llegar a la fragmentación, como pudo ser corroborado por electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, cuando el DNA fue expuesto por 180 días a la concentración de glucosa de 30 mM, considerada como condición de hiperglucemia, si hubo daño al DNA. Este daño fue evidenciado por fragmentación vista por electroforesis en gel de agarosa y por la modificación en los patrones de absorción en la región ultravioleta, específicamente en la absorbancia a 260 nm a los 30 días.

El DNA aislado de espermatozoides de cola de epidídimo fue más sensible a la acción de la glucosa 30 mM cuando la incubación se llevó a cabo por 180 días.

En las condiciones de este estudio la fragmentación fue parcialmente inhibida por las poliaminas, particularmente por la espermina y la espermidina, en menor grado por la putrescina, siendo la espermina la que mostró el mejor efecto protector del DNA, pero sin lograr evitar totalmente la fragmentación. El efecto protector de la espermina y la espermidina puede estar relacionado con sus propiedades policatiónicas al contener un mayor número de grupos amino. Esta observación puede explicar, parcialmente, los requerimientos tan elevados de poliaminas en el semen, particularmente de espermina cuyas concentraciones se reportan de 5 a 15 mM en el semen humano.

11. BIBLIOGRAFIA.

- 1 Formiguera X, Canton A: Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:1125-1146.
- 2 Amaral S, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J: Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Curr Diabetes Rev* 2008;4:46-54.
- 3 Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K, Al-Hasani S: DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online* 2007;14:384-395.
- 4 Amaral S, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J: Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Curr Diabetes Rev* 2008;4:46-54.
- 5 Bustos-Obregon E, Courot M, Flechon JE, Hochereau-de-Reviere MT, Holstein AF: Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man. *Andrologia* 1975;7:141-163.
- 6 Ausio J, Eirin-Lopez JM, Frehlick LJ: Evolution of vertebrate chromosomal sperm proteins: implications for fertility and sperm competition. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;65:63-79.
- 7 Oliva R: Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12:417-435.
- 8 Glenn DR, McClure N, Lewis SE: The hidden impact of diabetes on male sexual dysfunction and fertility. *Hum Fertil (Camb)* 2003;6:174-179.
- 9 Cornwall GA: New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009;15:213-227.
- 10 Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine.: The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil Steril* 2006;86:S35-S37.
- 11 Aitken RJ: Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* 2006;29:69-75.
- 12 Shafik A, Shafik AA, Shafik I, El SO: Molecular andrology as related to sperm DNA fragmentation/sperm chromatin biotechnology. *Arch Androl* 2006;52:299-310.
- 13 Zini A, Libman J: Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol* 2006;16:428-434.

- 14 Evenson DP, Wixon R: Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 2006;65:979-991.
- 15 Alvarez JG: DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. *Minerva Ginecol* 2003;55:233-239.
- 16 Young KE, Robbins WA, Xun L, Elashoff D, Rothmann SA, Perreault SD: Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. *J Androl* 2003;24:853-861.
- 17 Irvine DS: Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod* 1998;13 Suppl 1:33-44.
- 18 Young KE, Robbins WA, Xun L, Elashoff D, Rothmann SA, Perreault SD: Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. *J Androl* 2003;24:853-861.
- 19 Giwercman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, Spano M: Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril* 2003;80:1404-1412.
- 20 Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G: Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21:2876-2881.
- 21 Evenson DP, Wixon R: Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2008;90:1229-1231.
- 22 Erenpreiss J, Elzanaty S, Giwercman A: Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl* 2008;10:786-790.
- 23 Mallidis C, Agbaje IM, Rogers DA, Glenn JV, McCullough S, Atkinson AB, et al: Distribution of the receptor for advanced glycation end products in the human male reproductive tract: prevalence in men with diabetes mellitus. *Hum Reprod* 2007;22:2169-2177.
- 24 Mallidis C, Agbaje IM, Rogers DA, Glenn JV, Pringle R, Atkinson AB, et al: Advanced glycation end products accumulate in the reproductive tract of men with diabetes. *Int J Androl* 2008.
- 25 Formiguera X, Canton A: Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:1125-1146.
- 26 Cadenas E: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989;58:79-110.

- 27 Halliwell B, Gutteridge JM: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1-14.
- 28 Martin GR, Danner DB, Holbrook NJ: Aging--causes and defenses. *Annu Rev Med* 1993;44:419-429.
- 29 MacGregor JT, Schlegel R, Wehr CM, Alperin P, Ames BN: Cytogenetic damage induced by folate deficiency in mice is enhanced by caffeine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:9962-9965.
- 30 Harley CB, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;345:458-460.
- 31 Auerbach AD, Adler B, Chaganti RS: Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. *Pediatrics* 1981;67:128-135.
- 32 Ames BN, Shigenaga MK: Oxidants are a major contributor to aging. *Ann N Y Acad Sci* 1992;663:85-96.
- 33 Yen FF, Matsuyama SS, Jarvik LF: X chromatin and chromosome examination in aged women. *Mech Ageing Dev* 1981;16:55-60.
- 34 Harley CB, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;345:458-460.
- 35 Franceschi C, Monti D, Scarfi MR, Zeni O, Temperani P, Emilia G, Sansoni P, Lioi MB, Troiano L, Agnesini C, .: Genomic instability and aging. Studies in centenarians (successful aging) and in patients with Down's syndrome (accelerated aging). *Ann N Y Acad Sci* 1992;663:4-16.
- 36 Illeni MT, Rovini D, Grassi C, Lombardo C, Placucci M, Squicciarini P, Cascinelli N, Ghidoni A: Sister chromatid exchange analysis in familial groups of malignant melanoma patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;53:237-246.
- 37 Illeni MT, Rovini D, Grassi C, Lombardo C, Placucci M, Squicciarini P, Cascinelli N, Ghidoni A: Sister chromatid exchange analysis in familial groups of malignant melanoma patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;53:237-246.
- 38 Franceschi C, Monti D, Scarfi MR, Zeni O, Temperani P, Emilia G, Sansoni P, Lioi MB, Troiano L, Agnesini C, .: Genomic instability and aging. Studies in centenarians (successful aging) and in patients with Down's syndrome (accelerated aging). *Ann N Y Acad Sci* 1992;663:4-16.
- 39 Fenech M, Morley AA: Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res* 1986;161:193-198.

- 40 Roche E, Romero-Alvira D: Oxidative stress in some dementia types. *Med Hypotheses* 1993;40:342-350.
- 41 Wolff SP, Dean RT: Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem J* 1986;234:399-403.
- 42 Wei H: Activation of oncogenes and/or inactivation of anti-oncogenes by reactive oxygen species. *Med Hypotheses* 1992;39:267-270.
- 43 Roche E, Romero-Alvira D: Oxidative stress in some dementia types. *Med Hypotheses* 1993;40:342-350.
- 44 Wolff SP, Dean RT: Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem J* 1986;234:399-403.
- 45 Grivell LA: Mitochondrial DNA. *Sci Am* 1983;248:78-89.
- 46 Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-465.
- 47 Clayton DA: Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu Rev Biochem* 1984;53:573-594.
- 48 Cummins JM: The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis. *Reprod Biomed Online* 2002;4:176-182.
- 49 Cann RL, Stoneking M, Wilson AC: Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987;325:31-36.
- 50 Richter C, Park JW, Ames BN: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:6465-6467.
- 51 Grivell LA: Mitochondrial DNA. *Sci Am* 1983;248:78-89.
- 52 Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-465.
- 53 Gerbitz KD: Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes? *Diabetologia* 1992;35:1181-1186.
- 54 Takeyama N, Matsuo N, Tanaka T: Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca(2+)-dependent inner-membrane permeability transition. *Biochem J* 1993;294 (Pt 3):719-725.

- 55 Shay JW, Pierce DJ, Werbin H: Mitochondrial DNA copy number is proportional to total cell DNA under a variety of growth conditions. *J Biol Chem* 1990;265:14802-14807.
- 56 Kunkel TA, Loeb LA: Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science* 1981;213:765-767.
- 57 Gerbitz KD: Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes? *Diabetologia* 1992;35:1181-1186.
- 58 Driggers WJ, LeDoux SP, Wilson GL: Repair of oxidative damage within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells. *J Biol Chem* 1993;268:22042-22045.
- 59 Croteau DL, Bohr VA: Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:25409-25412.
- 60 Larsson NG: Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. *Annu Rev Biochem* 2010.
- 61 Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:7915-7922.
- 62 Vrieling H, Tates AD, Natarajan AT, van Zeeland AA: Age-related accumulation of mutations in human T-lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1992;663:36-42.
- 63 Favreau LV, Pickett CB: Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Characterization of a DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element and induction by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *J Biol Chem* 1993;268:19875-19881.
- 64 Gough AC, Miles JS, Spurr NK, Moss JE, Gaedigk A, Eichelbaum M, Wolf CR: Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature* 1990;347:773-776.
- 65 Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, .: Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 1993;261:1047-1051.
- 66 Brunner HG, Nelen M, Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA: Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 1993;262:578-580.
- 67 Newport JW, Forbes DJ: The nucleus: structure, function, and dynamics. *Annu Rev Biochem* 1987;56:535-565.
- 68 Richter C, Park JW, Ames BN: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:6465-6467.

- 69 Pegg AE, McCann PP: Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 1982;243:C212-C221.
- 70 Warrant RW, Kim SH: alpha-Helix-double helix interaction shown in the structure of a protamine-transfer RNA complex and a nucleoprotamine model. *Nature* 1978;271:130-135.
- 71 Pegg AE, McCann PP: Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 1982;243:C212-C221.
- 72 Warrant RW, Kim SH: alpha-Helix-double helix interaction shown in the structure of a protamine-transfer RNA complex and a nucleoprotamine model. *Nature* 1978;271:130-135.
- 73 Grunstein M: Histones as regulators of genes. *Sci Am* 1992;267:68-74B.
- 74 The cell nucleus.; in: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (eds): *Molecular Biology of the cell* (2a. ed). NuevaYork: Garland Publishing, Inc., 1989, pp 480-549.
- 75 Bellomo G, Vairetti M, Stivala L, Mirabelli F, Richelmi P, Orrenius S: Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4412-4416.
- 76 Reed JC: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
- 77 Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN: Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:11003-11006.
- 78 Satoh MS, Poirier GG, Lindahl T: NAD(+)-dependent repair of damaged DNA by human cell extracts. *J Biol Chem* 1993;268:5480-5487.
- 79 Monti D, Troiano L, Tropea F, Grassilli E, Cossarizza A, Barozzi D, Pelloni MC, Tamassia MG, Bellomo G, Franceschi C: Apoptosis--programmed cell death: a role in the aging process? *Am J Clin Nutr* 1992;55:1208S-1214S.
- 80 Cleaver JE: It was a very good year for DNA repair. *Cell* 1994;76:1-4.
- 81 Selby CP, Sancar A: Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science* 1993;260:53-58.
- 82 Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Chambon P, Egly JM: DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* 1993;260:58-63.

- 83 Ruby SW, Szostak JW: Specific *Saccharomyces cerevisiae* genes are expressed in response to DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol* 1985;5:75-84.
- 84 Holbrook NJ, Fornace AJ, Jr.: Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol* 1991;3:825-833.
- 85 Fornace AJ, Jr., Nebert DW, Hollander MC, Luethy JD, Papathanasiou M, Fargnoli J, Holbrook NJ: Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol* 1989;9:4196-4203.
- 86 Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, .: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-261.
- 87 Hart RW, Setlow RB: Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:2169-2173.
- 88 Hanawalt PC, Gee P, Ho L, Hsu RK, Kane CJ: Genomic heterogeneity of DNA repair. Role in aging? *Ann N Y Acad Sci* 1992;663:17-25.
- 89 Orr WC, Sohal RS: Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994;263:1128-1130.
- 90 Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT: Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006;27:53-59.
- 91 Igarashi K, Kashiwagi K: Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:39-51.
- 92 Bachrach U: Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Curr Protein Pept Sci* 2005;6:559-566.
- 93 Mendez JD: Polyamines and human reproduction; in: *The physiology of polyamines* Bacharch, U and Heimer, Y. (Eds) C.R.C. Press, Inc Florida, U.S.A., 1989, pp 23-38.
- 94 Suzuki O, Matsumoto T, Katsumata Y: Determination of polyamine oxidase activities in human tissues. *Experientia* 1984;40:838-839.
- 95 MacIndoe JH, Turkington RW: Hormonal regulation of spermidine formation during spermatogenesis in the rat. *Endocrinology* 1973;92:595-605.
- 96 Salisbury GW: *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Thaddeus Mann. Methuen, London; Wiley, New York, 1964. *Science* 1965;147:727-72a.

- 97 Tabor H, Tabor CW: Spermidine, spermine and related amines. *Pharmacol Rev* 1964;16:245-300.
- 98 Rhodes JB, Williams-Ashman HG: Observations on polyamines in male accessory glands of reproduction. *Med Exp Int J Exp Med* 1964;10:281-285.
- 99 Janne J, Williams-Ashman HG: Dissociation of putrescine-activated decarboxylation of S-adenosyl-L-methionine from the enzymic synthesis of spermidine and spermine by purified prostatic enzyme preparations. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;42:222-229.
- 100 Janne J, Williams-Ashman HG, Schenone A: Spermidine synthesizing enzymes in baker's yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;43:1362-1368.
- 101 Zappia V, Carteni-Farina M, Della PG: S-adenosylmethionine decarboxylase from human prostate. Activation by putrescine. *Biochem J* 1972;129:703-709.
- 102 Huggins C: The physiology of the prostate gland. *Physiol Rev* 1945;25:281-295.
- 103 Salisbury GW: *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Thaddeus Mann. Methuen, London; Wiley, New York, 1964. xxiv + 493 pp. Illus. \$16.50. *Science* 1965;147:727-72a.
- 104 Huggins C: The physiology of the prostate gland. *Physiol Rev* 1945;25:281-295.
- 105 Pegg AE, Lockwood DH, Williams-Ashman HG: Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymic synthesis during androgen-induced prostatic growth. *Biochem J* 1970;117:17-31.
- 106 Salisbury GW: *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Thaddeus Mann. Methuen, London; Wiley, New York, 1964. xxiv + 493 pp. Illus. \$16.50. *Science* 1965;147:727-72a.
- 107 . White I G: The effect of some seminal constituents and related substances on diluted mammalian spermatozoa, *Aust. J. Biol. Sci.* 7 (1954) 379-390.
- 108 Harrison GA: Spermine in human tissues. *Biochem J* 1931;25:1885-1892.
- 109 Rubinstein S, Breitbart H: Cellular localization of polyamines: cytochemical and ultrastructural methods providing new clues to polyamine function in ram spermatozoa. *Biol Cell* 1994;81:177-183.
- 110 Sheth AR, Moodbidri SB: Significance of polyamines in reproduction. *Adv Sex Horm Res* 1977;3:51-74.
- 111 Hicks JJ, Pedron N, Rosado A: Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens, and follicular fluid. *Fertil Steril* 1972;23:886-893.

- 112 Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RA, Jr.: The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11140-11145.
- 113 Sava IG, Battaglia V, Rossi CA, Salvi M, Toninello A: Free radical scavenging action of the natural polyamine spermine in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1272-1281.
- 114 Mendez JD: *Experimentos Básicos de Bioquímica*. México D.F., Editorial Prado S.A. de C.V., 2001.
- 115 Brownlee M: The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med* 1995;18:275-281.
- 116 Rubin A, Babbott D: Impotence and diabetes mellitus. *J Am Med Assoc* 1958;168:498-500.
- 117 Schoefling K, Federlin K, Ditschuneit H, Pfeiffer EF: Disorders of sexual function in male diabetics. *Diabetes* 1963;12:519-527.
- 118 Bemelmans BL, Meuleman EJ, Doesburg WH, Notermans SL, Debruyne FM: Erectile dysfunction in diabetic men: the neurological factor revisited. *J Urol* 1994;151:884-889.
- 119 Distiller LA, Sagel J, Morley JE, Seftel HC: Pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1975;24:378-380.
- 120 Ando A, Giacchetto C, Beraldi E, Panno ML, Lombardi A, Sposato G, Golpi G: The influence of age on Leydig cell function in patients with varicocele. *Int J Androl* 1984;7:104-118.
- 121 Calvo JC, Baranao JL, Tesone M, Charreau EH: Hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis in the streptozotocin-induced diabetic male rat. *J Steroid Biochem* 1984;20:769-772.
- 122 Djursing H, Hagen C, Nyholm HC, Carstensen L, Andersen AN: Gonadotropin responses to gonadotropin-releasing hormone and prolactin responses to thyrotropin-releasing hormone and metoclopramide in women with amenorrhea and insulin-treated diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:1016-1021.
- 123 Handelsman DJ, Spaliviero JA, Turtle JR: Hypothalamic-pituitary function in experimental uremic hypogonadism. *Endocrinology* 1985;117:1984-1995.
- 124 Murray FT, Wyss HU, Thomas RG, Spevack M, Glaros AG: Gonadal dysfunction in diabetic men with organic impotence. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:127-135.
- 125 Dinulovic D, Radonjic G: Diabetes mellitus/male infertility. *Arch Androl* 1990;25:277-293.

- 126 Bartak V, Josifko M, Horackova M: Juvenile diabetes and human sperm quality. *Int J Fertil* 1975;20:30-32.
- 127 Paz GF, Sofer A, Homonnai ZT, Kraicer PF: Human semen analysis: seminal plasma and prostatic fluid compositions and their interrelations with sperm quality. *Int J Fertil* 1977;22:140-147.
- 128 Paz G, Homonnai ZT, Kraicer PF, Harell A: A method for the improvement of human sperm motility in vitro. *Harefuah* 1976;91:117-119.
- 129 Garcia-Diez LC, Corrales Hernandez JJ, Hernandez-Diaz J, Pedraz MJ, Miralles JM: Semen characteristics and diabetes mellitus: significance of insulin in male infertility. *Arch Androl* 1991;26:119-128.
- 130 Kozlov GI, Kamalov KG: [Sperm characterization in patients with diabetes mellitus suffering from sexual disorders]. *Probl Endokrinol (Mosk)* 1989;35:6-9.
- 131 Vignon F, Le FA, Montagnon D, Pradignac A, Cranz C, Winiszewsky P, Pinget M: Comparative study of semen in diabetic and healthy men. *Diabete Metab* 1991;17:350-354.
- 132 Bartak V, Josifko M, Horackova M: Juvenile diabetes and human sperm quality. *Int J Fertil* 1975;20:30-32.
- 133 Kozlov GI, Kamalov KG: [Sperm characterization in patients with diabetes mellitus suffering from sexual disorders]. *Probl Endokrinol (Mosk)* 1989;35:6-9.
- 134 Garcia-Diez LC, Corrales Hernandez JJ, Hernandez-Diaz J, Pedraz MJ, Miralles JM: Semen characteristics and diabetes mellitus: significance of insulin in male infertility. *Arch Androl* 1991;26:119-128.
- 135 Ali MA: Effects of mesencephalic lesion on testes, seminal vesicles and adrenal glands of albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 1993;37:97-103.
- 136 Handelsman DJ, Spaliviero JA, Turtle JR: Testicular function in experimental uremia. *Endocrinology* 1985;117:1974-1983.
- 137 Karl AF, Griswold MD: Prolonged ABP synthesis by Sertoli cells cultured in defined medium. *Cell Biol Int Rep* 1980;4:669-674.
- 138 Adashi EY, Fabrics C, Hsueh AJ: Insulin augmentation of testosterone production in a primary culture of rat testicular cells. *Biol Reprod* 1982;26:270-280.
- 139 Lin T, Haskell J, Vinson N, Terracio L: Characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: a comparative study. *Endocrinology* 1986;119:1641-1647.

- 140 Lin T, Haskell J, Vinson N, Terracio L: Direct stimulatory effects of insulin-like growth factor-I on Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;137:950-956.
- 141 Garcia-Diez LC, Corrales Hernandez JJ, Hernandez-Diaz J, Pedraz MJ, Miralles JM: Semen characteristics and diabetes mellitus: significance of insulin in male infertility. *Arch Androl* 1991;26:119-128.
- 142 Spellacy WN, Cantor B, Snyder F, Buhi WC, Birk SA: Carbohydrate metabolism and the semen profile: glucose, insulin, and sperm studies. *Fertil Steril* 1979;32:562-565.
- 143 Garcia-Diez LC, Corrales Hernandez JJ, Hernandez-Diaz J, Pedraz MJ, Miralles JM: Semen characteristics and diabetes mellitus: significance of insulin in male infertility. *Arch Androl* 1991;26:119-128.
- 144 Nogowski L, Nowak KW: Arginine, administered in various ways, as a stimulator of insulin secretion in the rabbit. *Horm Metab Res* 1986;18:730-733.
- 145 Lockwood DH, Lipsky JJ, Meronk F, Jr., East LE: Actions of polyamines on lipid and glucose metabolism of fat cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;44:601-607.
- 146 Qian ZU, Tsai YH, Steinberger A, Lu M, Greenfield AR, Haddox MK: Localization of ornithine decarboxylase in rat testicular cells and epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1985;33:1189-1195.
- 147 Mendez JD: Polyamines and human reproduction; in: *The physiology of polyamines* Bacharch, U and Heimer, Y. (Eds) C.R.C. Press, Inc Florida, U.S.A., 1989, pp 23-38.
- 148 Oka T, Perry JW: Arginase affects lactogenesis through its influence on the biosynthesis of spermidine. *Nature* 1974;250:660-661.
- 149 Méndez JD, Martinez: Arginase activity in ram epididymal/ejaculated spermatozoa. *ARTA* 1995;7:131-136.
- 150 Bucala R, Model P, Cerami A: Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:105-109.
- 151 Price GB, Modak SP, Makinodan T: Age-associated changes in the DNA of mouse tissue. *Science* 1971;171:917-920.
- 152 Méndez JD: Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gac Med Méx* 2003;139:49-55.
- 153 Mendez JD, Leal LI: Inhibition of in vitro pyrroline formation by L-arginine and polyamines. *Biomed Pharmacother* 2004;58:598-604.

- 154 Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA: Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829-843.
- 155 Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Jr., Falcone T, Agarwal A: Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;80:531-535.
- 156 Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, bdel-Hafez MA, Thomas AJ, Jr., Agarwal A: Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004;19:129-138.
- 157 Shen HM, Chia SE, Ong CN: Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 1999;20:718-723.
- 158 Khan AU, Mei YH, Wilson T: A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:11426-11427.
- 159 Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RA, Jr.: The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11140-11145.

12. ANEXO.

12.1. Electroforesis.

La electroforesis es una de las técnicas más usadas en bioquímica y biología molecular, se usa para separar y a veces purificar macromoléculas; especialmente proteínas y ácidos nucleicos, que difieren en tamaño, carga o conformación.

Cuando las moléculas cargadas son sometidas a un campo eléctrico, migran hacia el polo positivo (ánodo) o negativo (cátodo) de acuerdo a su carga.

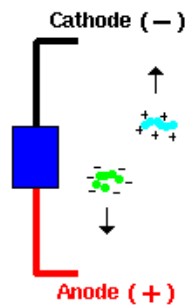


Figura 62. Campo eléctrico.

Mientras que las proteínas pueden tener carga neta positiva o negativa, los ácidos nucleicos tienen carga negativa debido a sus grupos fosfato y migran hacia el ánodo. La electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos se realiza en una matriz o “gel de agarosa”. El gel tiene “pocillos” para cargar la muestra, se sumerge en un amortiguador adecuado de electroforesis que provee iones para mantener una corriente y el pH a un valor relativamente constante.

12.2. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.

La agarosa es un polisacárido extraído de un alga, se usa a concentraciones de 0.5 al 2 %. A mayor concentración de agarosa se obtiene un gel más consistente. Los gels de agarosa se prepararon mezclando agarosa en polvo con una solución amortiguadora, se fundió con calor y se vertió en el “molde”.

Los gels de agarosa tienen un amplio rango de separación, pero un poder de resolución relativamente bajo. Variando la concentración de agarosa se pueden separar fragmentos de DNA desde unas 200 a 50000 pares de base.

El equipo y materiales necesarios para una corrida electroforética en un gel de agarosa fueron:

- Una cámara de electroforesis
- Una fuente de poder
- Un peine para formar “pocillos” donde se ponen las muestras.
- Un amortiguador de electroforesis, normalmente Tris-acetato-EDTA (TAE) o Tris-borato- EDTA (TBE).
- Amortiguador de carga azul de bromofenol 0.1 % + glicerol al 15 %

Amortiguador de carga, el cual contenía glicerol para aumentar la densidad y permitir que la muestra se deposite en los pocillos, además azul de bromofenol que migra en el frente del lo que permite monitorear hasta donde ha corrido la muestra.

- Bromuro de etidio, un compuesto fluorescente que permite ver los ácidos nucleicos.
- Transiluminador (con luz ultravioleta).
- Analizador de imágenes.

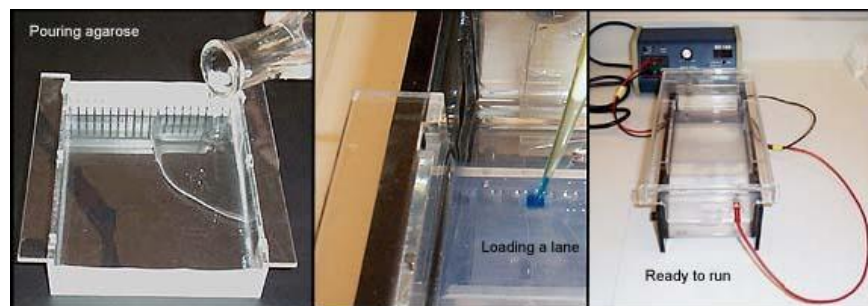


Figura 63. Equipo de electroforesis empleado en la separación de DNA utilizando gel de agarosa al 1 %.

12.3. Migración de los fragmentos de DNA en gel de agarosa.

Los fragmentos de DNA lineal migran a través de los geles de agarosa con una movilidad inversamente proporcional al \log_{10} de su masa molecular. Entre los diferentes factores que afectan la movilidad de los fragmentos de DNA en geles de agarosa y que puede modificarse para optimizar la separación de los fragmentos está: La concentración de agarosa: Al correr geles con diferente concentración de agarosa se pueden resolver fragmentos de DNA de diferentes tamaños, como se muestra en la Figura 18.

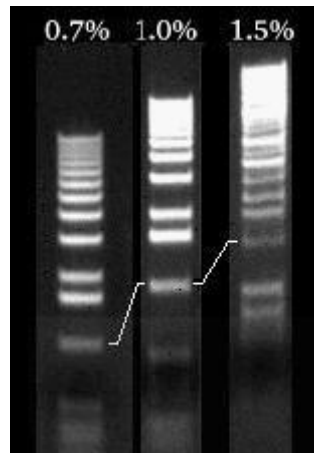


Figura 64.- Patrones electroforéticos del DNA con diferente concentración de agarosa.

12.4. Reactivos.

1. Alcohol etílico absoluto	Sigma	E-7023
2. Alcohol isoamílico	Sigma	405-7
3. Ditioneitol (DTT)	Sigma	D-0632
4. EDTA	Sigma	E-9884
5. Ficoll-Paque	Sigma	1077-1
6. Glucosa	Sigma	G-5250
7. Trizma-Base	Sigma	T-1503
8. Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Sigma	L-4509
9. Poliaminas		
Espermina	Sigma	S-2876
Espermidina	Sigma	S-2501
Putrescina	ICN	20937
10. Cloruro de sodio	Merck	6404
11. Hidróxido de sodio	Merck	1.06498
12. Cloroformo	Amresco	0757
13. Agarosa	Promega	V-3121
14. Bromuro de etidio		
15. HClO ₄		

12.5. Material de Laboratorio.

1. Estuche de disección.
2. Gasas estériles.
3. Jeringas desechables de 5, 10 y 20 ml
4. Pipetas Pasteur estériles
5. Tubos de centrifuga estériles de 50 ml
6. Vasos de precipitado
7. Matraz Erlenmeyer de 250 mL
8. Viales de 12 mL.

12.6. Equipo de Laboratorio.

1. Balanza Analítica OHAUS.
2. Campana de flujo laminar (LABCONCO).
3. Centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5072R).
4. Agitador Vortex (Vortex Genie 2).
5. Microscopio Invertido.
6. Cámara de Neubauer.
7. Incubadora Precisión.
8. Espectrofotómetro.
9. Horno de microondas.
10. Cámara de electroforesis (Mini-Sub Cell GT BIO-RAD).
11. Fotodocumentador (Digital Imaging System IS-1000 Alpha Innotech Corporation) con Transiluminador de luz ultravioleta.



Figura 65. Balanza analítica (1) y campana de flujo laminar (2).



Figura 66. Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5072R (3) y Microscopio Invertido (5).



Figura 67. Incubadora Precisión (7) y Espectrofotómetro Perkin Elmer (8).



Figura 68. Cámara de electroforesis (10) y analizador de imágenes (11).