

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Metaloproteínas transportadoras de hierro en plasma seminal y su posible función como moléculas reguladoras del metabolismo espermático

*Iron-binding metalloproteins in seminal plasma and their possible function as regulatory molecules of sperm metabolism*

Brufman, Adriana<sup>1,2\*</sup>; Brunori, Magalí<sup>1</sup>; Raspo, Esteban<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología de la Reproducción (LIR), Departamento de Bioquímica Clínica, Área Inmunología, Facultad de Ciencias Bioquímica y Farmacéuticas.

<sup>2</sup>Consejo de Investigaciones Universidad Nacional de Rosario (CIUNR). Rosario, Santa Fe, Argentina.

\*Contacto: Brufman, Adriana, Agrelo n° 2101 (S200500C) Rosario, Santa Fe, Argentina; abrufman@fbiof.unr.edu.ar

**Resumen** Introducción: el plasma seminal (PS) es un modulador de la función espermática; por esta razón, es necesario caracterizar adecuadamente su composición molecular. El hierro (Fe) juega un papel importante en la espermatogénesis. En el transporte, la captación celular y el almacenamiento de hierro intervienen la transferrina (Tf), el receptor celular de membrana de la transferrina y la ferritina (FN), respectivamente. Las vías metabólicas del Fe en los testículos aún se desconocen. Objetivos: el objetivo del trabajo fue estudiar componentes bioquímicos como proteínas totales, (Pt), Fe, FN y Tf, en PS de individuos jóvenes y establecer valores referenciales para nuestro laboratorio. Luego, estos valores se relacionaron con parámetros del espermograma y producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), a fin de conocer la fisiología del hierro en el testículo. Materiales y métodos: se estudiaron 115 muestras de semen y suero; en ambos fluidos se determinó la concentración de Tf, Fe, Pt y FN. Se realizó un espermograma básico y medición de ERO (T- Bars, MOST, nitritos). Resultados y conclusión: los marcadores bioquímicos estudiados fueron significativamente diferentes en plasma seminal y suero, y no se encontró relación entre los mismos. La concentración de Tf en PS tiene una relación lineal directa con la concentración espermática y la movilidad. Se evidenció una relación inversa entre el estrés oxidativo y los niveles de Tf testicular, la cual podría deberse a su función antioxidante en PS. El conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la función espermática es de gran importancia para la elección del diagnóstico y tratamiento.

**Palabras clave:** plasma seminal, metaloproteínas, estrés oxidativo, infertilidad humana.

**Abstract** Introduction. Seminal plasma (SP) is a sperm function modulator. Thus, it is necessary to adequately characterize its molecular composition. Iron (Fe) plays an important role in spermatogenesis. The transport, cellular uptake, and storage of Fe involve transferrin (Tf), the cellular membrane receptor for Tf, and ferritin (FN), respectively. The metabolic pathways of Fe in human testes are still unknown. Objectives. The aim of the work was to study biochemical components such as total proteins (TP), Fe, FN and Tf in SP of young individuals, and to establish reference values for our laboratory. These values were then correlated to semen parameters, sperm functional tests and production of reactive oxygen species (ROS) to understand the physiology of Fe in the testis. Materials and Methods. One hundred and fifteen semen and serum samples were studied, and the concentration of Tf, Fe, TP and FN was determined in both fluids. A basic semen analysis and ROS measurement [T-Bars, MOST, Nitrites] were performed. Results and conclusions. The biochemical markers studied were significantly different in seminal plasma and serum, and no relationship was found between them. Tf concentration in SP had a direct linear relationship with sperm concentration and motility. An inverse relationship between oxidative stress and testicular Tf levels was evidenced, which could be due to its antioxidant function in SP. Knowledge of the pathophysiological mechanisms of sperm function is critical for the correct diagnosis and treatment of human infertility.

**Key words:** seminal plasma, metalloproteins, oxidative stress, human infertility.

## Introducción

La infertilidad afecta al 15 % de las parejas en todo el mundo y, en la mitad de los casos, está relacionada con el factor masculino.<sup>1</sup> Por eso, el análisis de semen constituye el paso inicial en el estudio del factor masculino en una pareja infértil.

Existe un amplio debate sobre el significado diagnóstico y pronóstico de los parámetros bioquímicos del semen, excepto en casos de pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa, en la evaluación de la infertilidad masculina. En muchos casos, la causa de infertilidad no es identificada y se clasifica como idiopática o sin causa aparente, lo que sugiere el poco conocimiento acerca de los mecanismos básicos del proceso reproductivo.<sup>2</sup> En estos casos, el análisis de semen de rutina no explica las anomalías de la fecundación.<sup>3</sup>

El semen es una suspensión concentrada de espermatozoides, almacenada en el epidídimo, que se mezcla y diluye con secreciones de los órganos sexuales accesorios.<sup>6</sup> Está formado por el componente celular, que representa un 10 % del volumen total del eyaculado, y el acelular, llamado genéricamente "plasma seminal" (PS).<sup>4</sup>

El plasma seminal contiene lípidos, carbohidratos, iones, péptidos y proteínas, que son secretados por diferentes regiones del tracto reproductor masculino, incluidas las vesículas seminales, los conductos deferentes, las glándulas periuretrales, el epidídimo y la glándula prostática. No solo actúa como medio de transporte, protección y nutrición de los espermatozoides, sino también como modulador de la función espermática. Por esta razón, es necesario caracterizar adecuadamente la composición molecular del PS. El perfil proteico del PS es un tema en auge debido a la gran cantidad de proteínas que contiene (35 - 55 g/L). Tras una validación adicional, estas proteínas pueden ser útiles en la diferenciación clínica entre fertilidad e infertilidad, dado que ayudan a la protección al unirse a la superficie del espermatozoide durante la eyaculación y desempeñan un papel clave en la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión de espermatozoides y óvulos. Debido a esta especificidad, podrían ser consideradas como biomarcadores para la infertilidad masculina.<sup>5</sup>

La proteómica es un enfoque novedoso para el estudio de las funciones de las proteínas y la investigación de los procesos metabólicos para comprender mejor el funcionamiento de una célula o tejido a nivel molecular.<sup>6,7</sup>

## Metaloproteínas y hierro

Las metaloproteínas son moléculas que cuentan con iones metálicos en su composición. Las funciones de las mismas son muy variadas en las células: actúan como enzimas, proteínas de transporte y almacenamiento y en la transducción de señales. Aproximadamente de un cuarto a un tercio de todas las proteínas requieren metales para llevar a cabo sus funciones.

El hierro (Fe) juega un papel importante en la espermatogénesis. Es esencial en los procesos metabólicos, pero, en exceso, puede producir toxicidad. El transporte de hierro y sus

sistemas de absorción están estrictamente regulados. En los mamíferos, su homeostasis está regulada a niveles sistémicos y celulares a través de la hormona peptídica hepcidina y las proteínas reguladoras de hierro (PRH), respectivamente. Una tercera y muy efectiva forma de regular la homeostasis de los nutrientes es mediante la compartimentalización.

La ferritina (FN) es una molécula fijadora de hierro cuya función principal es almacenar este elemento para garantizar su disponibilidad en distintas funciones celulares. También desempeña un papel importante en la inflamación, en enfermedades neurodegenerativas y cáncer.

La transferrina (Tf) es el principal transportador de hierro en la mayoría de los organismos. El 1,5 % de las proteínas totales del plasma seminal está constituido por una isoforma de la Tf, llamada "transferrina testicular (TfT)", secretada por las células de Sertoli (CS).<sup>8</sup> Las CS juegan un papel crucial en la espermatogénesis, creando el microambiente apropiado y secretando proteínas críticas para el desarrollo adecuado de los espermatozoides. El complejo de unión CS-CS crea una barrera de permeabilidad llamada "barrera hematotesticular", que es indispensable para crear una compartimentalización fisiológica dentro del epitelio seminífero para el transporte de iones, aminoácidos, carbohidratos y proteínas.<sup>9</sup>

La figura 1 muestra un modelo de transporte de hierro en testículos murinos. En el transporte, la captación celular y el almacenamiento de hierro, intervienen la Tf, el receptor celular de membrana de la Tf y la FN, respectivamente. Aunque a nivel sistémico están establecidos los caminos metabólicos del Fe, los mecanismos aún se desconocen en los testículos.<sup>10</sup>

## Especies reactivas del oxígeno (ERO)

Las ERO son producidas principalmente por leucocitos o espermatozoides anormales e inmaduros y son un subproducto natural de las vías metabólicas oxidativas. Se requieren pequeñas cantidades de ERO para asegurar las funciones fisiológicas celulares normales, incluidas la espermatogénesis, la capacitación y la reacción acrosómica.<sup>11</sup> Cuando las ERO superan a los antioxidantes, se genera un estrés oxidativo (EO), que podría afectar de forma negativa la fertilidad. Por lo tanto, la medición precisa de ERO proporciona una herramienta vital en la evaluación inicial y el seguimiento de pacientes infértiles.

El plasma seminal contiene altas cantidades de antioxidantes que protegen los espermatozoides del daño del ADN y peroxidación lipídica.<sup>12</sup>

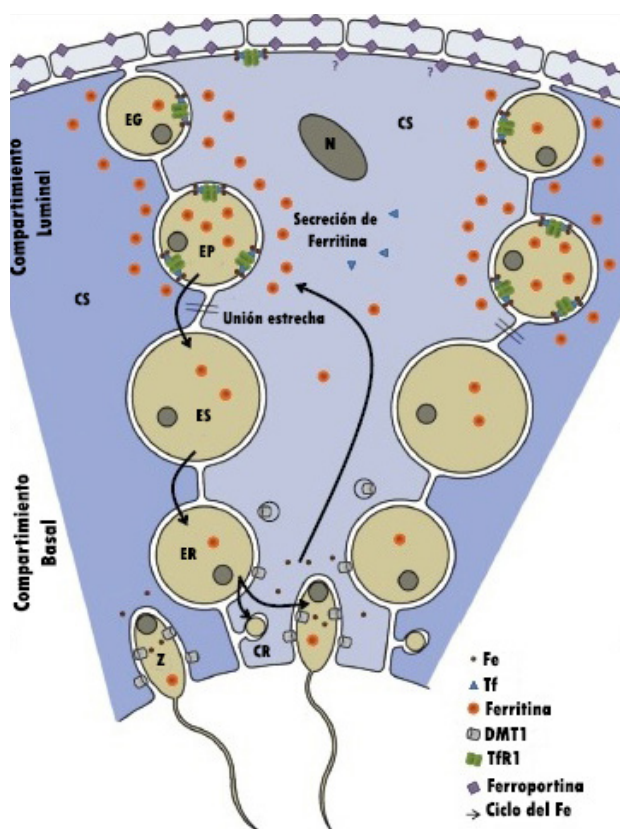
El objetivo del trabajo fue determinar las proteínas totales, hierro, ferritina y transferrina en plasma seminal en una población de individuos jóvenes y establecer valores referenciales para nuestro laboratorio; dichas determinaciones también fueron realizadas en suero para evaluar una posible relación entre los mismos. Luego, estos valores se relacionaron con parámetros del espermograma, pruebas funcionales espermáticas y producción de ERO, a fin de conocer la fisiología del hierro en el testículo.

## Materiales y métodos

Se estudiaron muestras de semen y suero de pacientes del Servicio de Urología del Hospital Escuela Eva Perón [Granadero Baigorria], Hospital Centenario [Rosario] y voluntarios sanos [edad:  $36,55 \pm 10,44$ ], desde noviembre de 2018 a septiembre de 2019.

Las muestras se obtuvieron previo consentimiento informado de los pacientes y a través de controles con autorización y aval de los profesionales tratantes, según la declaración de Helsinki. El proyecto marco de este trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Exp. 6060/368. Res. CD 592/2017. Las muestras de semen fueron recolectadas por masturbación luego de 72 h de abstinencia. Se evitó incluir muestras con bajo volumen (< 1 ml) y de pacientes con condiciones clínicas que pudieran interferir con los niveles de Tf y FN en plasma sanguíneo, tales como enfermedad hepática aguda o crónica, neoplasia, signos clínicos/laboratorio de infección/inflamación aguda o crónica por virus de hepatitis [A, B o C] infecciones, leucocitosis, fiebre, hipoproteinemia y enfermedades del metabolismo del hierro.

**Figura 1.** Modelo de compartimentalización de hierro en testículos.



► Se muestran tres CS y sus alrededores. La transferrina cede el hierro a las células germinales y los espermatozoides maduros lo devuelven al medio intratubular para ser almacenado por la ferritina. TS túbulo seminífero, EG espermatogonia, EP espermatocito primario, CS célula de Sertoli, Z espermatozoide, TfR1 receptor de transferrina, CR cuerpo residual.

## Procesamiento de las muestras de semen

Las muestras de semen, luego de su licuefacción (30 - 60 minutos de su recolección), fueron utilizadas para espermograma básico, según normas OMS 2010<sup>13</sup> y test funcionales. Posteriormente, se tomó una alícuota de 500  $\mu$ l para la técnica de *swim-up*. El resto de la muestra de semen se centrifugó por 30 minutos a una velocidad de 5.000 rpm por 10 min y el sobrenadante resultante, el plasma seminal, se colocó en un tubo Eppendorf® de 1,5 ml, se centrifugó nuevamente para eliminar las células remanentes y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

## Movilidad y concentración espermática

Para evaluar la movilidad espermática, se homogenizó la muestra y se colocaron 10  $\mu$ l en un portaobjetos. Se observaron con el microscopio de contraste de fase (Nikon Labophot2) 5 campos al azar con un aumento de 400x y se consideró el siguiente orden de categorías: MP, NP e I. El examen de movilidad se realizó por duplicado. Los valores de las distintas categorías se informaron como porcentajes de cada uno de los recuentos. Se definió como el límite de referencia inferior [LRI] para la movilidad total (MP+NP) un 40 % y para la MP del 32 %.<sup>13</sup>

Para determinar la concentración espermática, se realizó una dilución con *Mac Comber y Saunders* [NaHCO 35 % (p/v), Formol 40 % 1 % (v/v)]. El recuento se llevó a cabo por duplicado en Cámara de Neubauer (Boeco, Hamburg, HA, Alemania). El LRI para concentración es de  $15 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

## Preparación de muestras de suero

La recolección de 10 ml de sangre sin anticoagulante se realizó previa venopunción de miembro superior. Luego de la exudación de la muestra de sangre [aproximadamente 30 minutos en baño María a  $37^{\circ}\text{C}$ ], se centrifugó a 3.500 rpm durante 10 minutos. El suero se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de las determinaciones de laboratorio.

## Determinaciones bioquímicas

La determinación de Fe y Pt se realizó por método colorimétrico, en tanto FN se determinó por método inmunoturbidimétrico. Para dichas determinaciones, se utilizó el analizador Cobas C501® (Roche Diagnostics) en la medición en plasma seminal y suero de los pacientes en estudio. Para la medición de la concentración de Tf, en ambos fluidos se utilizó la técnica de inmunodifusión radial [IDR]. En suero se cuantificó con la placa de IDR comercial DIFFU-PLATE® (Biocientífica SA).

## Técnica de IDR para bajas concentraciones

Dado que la concentración de Tf en PS es 50 veces menor que en suero, las placas comerciales de IDR no tienen la sensibilidad suficiente; por ello, para medir la transferrina seminal, se desarrolló en nuestro laboratorio una placa de IDR adaptada a bajas concentraciones.

**Tabla I.** Valores poblacionales de proteínas totales, ferritina, hierro y transferrina en plasma seminal (n = 96).

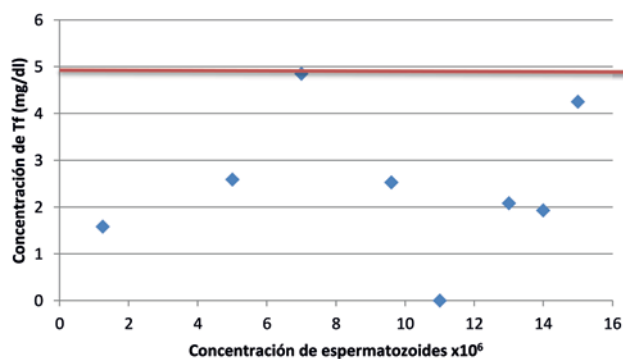
Metabolitos	V. Mín	V. Máx	M ± DE	Mediana	CV %
Pt (g/dL)	0,48	3,69	2,12 ± 0,75	2,17	35,70
FN (ng/dL)	20,00	457,60	249,30 ± 95,86	270,10	38,50
Fe (µg/dL)	12,00	64,00	29,32 ± 11,81	29,00	40,30
Tf (mg/dL)	1,80	16,33	5,19 ± 3,72	4,25	69,70

► Pt, proteínas totales; FN, ferritina; Fe, hierro; Tf, transferrina; V. Mín, valor mínimo; V. Máx, valor máximo; DE, desvío estándar; M ± DE, media ± desvío estándar; CV, coeficiente de variación.

Para la construcción de la placa de IDR, se utilizó agarosa (Fisher *Scientific*) al 1,5 P/V en *buffer* Veronal Sódico-Veronal (0,02 M con pH 8,6 y 0,005 M de cloruro de sodio) y se añadió anticuerpo comercial específico para Tf sérica (policlonal generado en conejo, Código: OSAX, *Dade Behring Inc. Newark, U.S.A*) para alcanzar una concentración final de  $3,80 \pm 1,30$  mg/dL [media ± DE].

#### Prueba de test espermático modificado (MOST)

Los espermatozoides son particularmente susceptibles al cambio oxidativo debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana plasmática y al limitado sistema antioxidante interno. Para realizar esta prueba se separan los espermatozoides móviles mediante la técnica de *swim-up*.<sup>13</sup> El Test de MOST evalúa la pérdida de movilidad de los espermatozoides luego de ser incubados por 4 h en baño de agua a 40 °C. El objetivo del MOST es el de producir una peroxidación lipídica forzada en los espermatozoides.<sup>14</sup> El valor de MOST se calcula dividiendo la movilidad traslativa final por la movilidad traslativa inicial post incubación de 4h a 40°C de la muestra capacitada por *swim up* / muestra capacitada pre incubación, utilizando un valor de corte de 0,39 para separar muestras con MOST normal (mayor a 0,39) y MOST anormal (menor o igual que 0,39).

**Figura 2.** Concentración relativa de espermatozoides/ concentración de TfT.

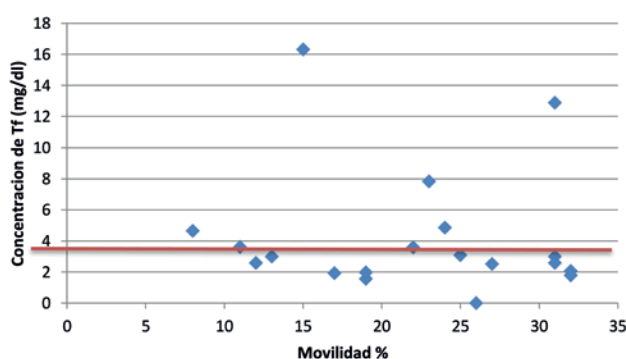
#### Determinación de ERO

##### Producción de óxido nítrico (NOx)

La medición de NOx se realizó mediante la determinación de la cantidad total de nitritos (NO<sup>2-</sup>), que son los productos estables del metabolismo de NO en el líquido seminal. Se utilizó el reactivo de Griess (solución acuosa de sulfanilamida al 1% y naftilenetendiamida al 0,1%) en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, el cual forma un cromóforo estable con NO<sup>2-</sup>, y que absorbe a 546 nm.<sup>15</sup> Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Jenway 6705, *Dunmow Essex*.

##### Peroxidación lipídica en PS, malonildialdeído (MDA)

El MDA es el producto final de la peroxidación de los ácidos grasos y un marcador de la actividad de los radicales libres. Para la medición de peroxidación lipídica en PS se utilizó el método del ácido tiobarbitúrico (TBA).<sup>16</sup> Aunque el TBA no solo se limita a la medición del MDA, es el método más empleado para determinar la oxidación lipídica y, por lo tanto, el estrés oxidativo. A 100 µL de PS, se le añadieron 200 µL de ácidotricloroacético al 25% y se incubó a 4°C durante 15 minutos; posteriormente, se centrifugaron a 4°C 5000 g durante 3 minutos, y el sobrenadante (100 µL) fue neutralizado con NaOH 4M. A 1 mL de la solución anterior se le adicionó 1 mL de TBA (*Merck Millipore*) al 0,7% y se incubó a 90°C durante 60 minutos. La reacción de color se midió espectrofotométricamente a 532 nm en la fase orgánica (1-butanol). Se utilizó 1-1-3-3 tetrametoxipropano (99% Sigma-

**Figura 3.** Movilidad progresiva/concentración de TfT.

**Tabla II.** Óxido Nítrico y concentración de Tf en plasma seminal.

Muestras de PS	Absorbancia (546nm)	Concentración de cromóforo* (ug/mL)	Tf seminal (mg/dL)
72	0,866	0,07544	7,31
74	0,699	0,06089	12,09
76	1,066	0,09286	3,59
77	0,543	0,04730	6,78
82	0,674	0,05871	16,33
83	1,046	0,09111	3,59
38	0,813	0,07082	10,58
44	0,651	0,05671	9,60
53	0,823	0,07169	4,85
56	0,769	0,06699	1,93
63	0,680	0,05923	8,67
Testigo**	0,574	0,05000	

► \*Solución acuosa de sulfanilamida y naftilendiamida en H3PO4 con los NOx de la muestra; \*\*solución acuosa de nitrito de sodio.

Aldrich] como estándar. La concentración de MDA [medida como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico, TBARs] se calculó en  $\mu\text{mol/L}$ .

#### Análisis estadístico

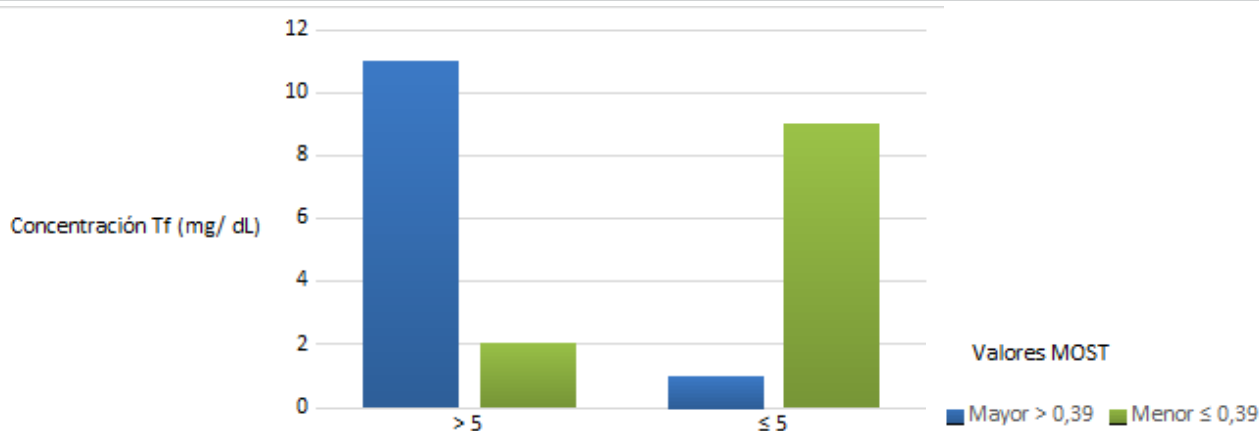
Para verificar una posible correlación entre las variables, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman debido a la falta de normalidad en la distribución de las variables involucradas. Para la comparación de las concentraciones de Tf, se realizó la categorización en grupos. Se utilizaron los programas *R Commander*® y *Excel (Microsoft)* para la base de datos. Se consideró una significación estadística cuando  $p < 0,05$ .

#### Resultados

Se analizaron 115 muestras de semen y suero de pacientes y voluntarios sanos (edad:  $36,55 \pm 10,44$ ). En la tabla I se observan los valores obtenidos: media (M), desvío estándar (DS) y coeficiente de variación (CV), para cada uno de los parámetros en PS.

Se estudió la concentración relativa de células espermáticas respecto de la concentración de Tf medida para dichas muestras. Se consideró el LRI (límite de referencia inferior) de la concentración de espermatozoides:  $15 \times 10^6$  espermatozoides por ml [13].

Este estudio resultó altamente significativo, ya que ninguna

**Figura 4.** Relación entre valores de MOST (Estrés Espermático) y valor medio de Tf seminal.

► Test de MOST en muestras seminales (n=23) con valores de Transferrina en PS mayores a la media [5 mg/dL] y valores menores o iguales a la media. Azul, Test de MOST normal (> 0,39). Verde, Test de MOST alterado (≤ 0,39).

de las muestras seleccionadas, las cuales no cumplían con el LRI, llega a la media poblacional de Tf (Figura 2). La concentración de Tf en PS tiene una relación directa con la concentración espermática ( $r = 0,3872$ ,  $p\text{-value} = 0,0070$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 8$ ).

Se seleccionaron las muestras con espermatozoides móviles progresivos, menores que el LRI (32 %), relacionándolos con la concentración de Tf. Al comparar el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos respecto de la concentración de Tf en plasma seminal, pudimos observar que el 85 % no alcanzaba la media poblacional. (Figura 3). El porcentaje de espermatozoides móviles progresivos también presenta una relación directa con la concentración de Tf ( $r = 0,3721$ ;  $p\text{-value} = 0,0139$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 19$ ).

En la tabla II, se observan los valores de absorbancia, concentración del cromóforo de  $\text{NO}_2^-$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) y Tf seminal ( $\text{mg/dL}$ ) para 11 muestras, usando como testigo una solución de 0,05 ppm de  $\text{NO}^-$  [ $\text{NO}_2\text{Na}$  (Merk-Millipore) Cat 7632 en agua bidestilada]. El coeficiente de correlación entre la concentración de nitrito y la Tf seminal evidenció una relación inversa, de mediana intensidad, con un valor de  $-0,53$ .

En la figura 4, se observa que, para valores de MOST anormales (menor o igual que 0,39), los valores de Tf seminal se encuentran, en su mayoría, por debajo del valor medio hallado en nuestra población (5  $\text{mg/dL}$ ). La concentración espermática no se relaciona con los valores de MOST ( $r = 0,12$ ;  $n = 23$ ).

En la tabla III, se observan las absorbancias correspondientes a las lecturas del MDA por el método de T-Bars comparadas con la concentración de Tf seminal de las muestras estudiadas ( $n = 14$ ).

El coeficiente de correlación entre la peroxidación lipídica y la TfT evidenció una leve relación inversa, con un valor de  $-0,39$ .

## Discusión

En la bibliografía consultada, se observaron valores muy dispares de los metabolitos estudiados, Fe, Tf, Fn y Pt, en plasma seminal, y por ello es necesario contar con valores referenciales propios, calculados en nuestra población y con nuestra metodología para avanzar en el conocimiento de la homeostasis del hierro en testículos.

En nuestro estudio, los marcadores bioquímicos analizados fueron significativamente diferentes en plasma seminal y suero y no se encontró relación entre los mismos. Estas diferencias pueden estar asociadas a la secreción selectiva de testículo, epidídimo y glándulas accesorias masculinas y al ambiente específico requerido para el metabolismo y mantenimiento de la función espermática.

En nuestros estudios, observamos que el 100 % de los pacientes con oligozoospermia ( $\text{LRI} < 15 \times 10^6 \text{ Z/mL}$ ) presentaban una concentración de TfT inferior a la media poblacional.

La correlación positiva entre la Tf en PS con el recuento y la concentración espermática confirma los reportes previos que asocian la disminución en su concentración en PS con la disminución de la expresión del RTf en pacientes con azoospermia no obstructiva<sup>17,18</sup> y en pacientes con oligozoospermia.<sup>1</sup>

Con respecto a la movilidad, encontramos una correlación

positiva entre la concentración de Tf en PS y el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos: más del 80% de las muestras con baja movilidad presentaban una concentración de Tf inferior a la media poblacional. Este resultado concuerda con la investigación de Yoshida<sup>19</sup>, que describe niveles bajos de Tf en pacientes con oligoastenoospermia.

Estos resultados sugieren que la disminución de la concentración de Tf en PS podría estar asociada a una espermatogénesis anormal que conduce a una disminución en el número y movilidad de los espermatozoides.

Las células de Sertoli actúan como sustento físico y metabólico del proceso de diferenciación de los espermatozoides. Las alteraciones en su función podrían estar relacionadas con una espermatogénesis anormal y mal funcionamiento testicular, lo que sugiere que la TfT podría usarse como un "índice clínico confiable", en sujetos clínicamente definidos, del estado funcional de las CS.<sup>20</sup>

Hasta el momento, sólo la medida de la proteína ligadora de andrógenos (ABP), otra glicoproteína secretada por las células de Sertoli, puede ser considerada como marcador específico funcional de estas células.<sup>21</sup> Sin embargo, su concentración en semen es muy baja y su determinación requiere métodos y equipamiento de alta complejidad. Por esta razón, sería importante que se pudiera utilizar la medición de Tf como posible marcador clínico de la función de las células de Sertoli en el hombre.

El EO interfiere con la capacitación espermática y puede causar daños tanto en la membrana del espermatozoide como en el ADN, afectando su potencial para fertilizar el óvulo y generar un embrión sano. La medición precisa tanto de ERO como de la capacidad antioxidante total es importante para determinar si el estrés oxidativo es la causa subyacente de la infertilidad masculina.

En nuestro trabajo, encontramos relación inversa entre los niveles de ERO y la concentración de TfT en plasma seminal. Los niveles de ERO fueron estudiados por dos métodos diferentes: T-BARS y nitritos.

Para medir el efecto de las ERO en la membrana, se utilizó el método de MOST, el cual mide peroxidación lipídica forzada de la membrana espermática. Observamos que todas las muestras con alta peroxidación (valores de MOST mayores que 39), independientemente de la concentración de espermatozoides en semen, tenían baja concentración de Tf.

Otros investigadores<sup>22,23</sup> han estudiado la función de las proteínas transportadoras de metales como antioxidantes. Se postula la función de la Tf como proteína antioxidante que contribuye a la integridad y función de la célula espermática.

Las técnicas disponibles actualmente en un laboratorio de andrología para el diagnóstico de la infertilidad masculina son numerosas, desde el estudio descriptivo tradicional del semen a los bioensayos funcionales y los criterios bioquímicos.<sup>24,13</sup>

La identificación de nuevas vías y mecanismos moleculares en la infertilidad masculina podría contribuir significativamente al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en este campo.<sup>25</sup>

Con n base en nuestros resultados, proponemos incorporar la TfT como un posible biomarcador de la función reproductiva masculina y realizar una evaluación sistemática de las ERO, tanto en PS como en la membrana del espermatozoide, que integre el protocolo de estudio de la pareja infértil, especialmente en aquellas parejas con infertilidad idiopática.

Es necesario estudiar un mayor número de pacientes y discriminarlos por patologías para poder concluir cuál técnica de medición de ERO es la más adecuada.

### Agradecimientos

Agradecemos al médico Urólogo Esteban Streiger, por su colaboración en la recopilación de datos, a la Lic. Alejandra Olmos por su asistencia en el procesamiento estadístico, al Químico Ricardo Botta por su asesoramiento en la preparación de reactivos y a los pacientes que participaron en el proyecto.

### Fuente de financiamiento

Proyecto de Investigación y Desarrollo, UNR. "Caracterización de Metaloproteínas Transportadoras de Hierro en Plasma Seminal y su Posible Función Como Moléculas Reguladoras del Metabolismo Espermático" (BI0595) [Res. CS N°650/2017].

### Referencias bibliográficas

- Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Jesudasan R, Gopalan B, et al. Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013; 11:11:38.
- Brufman AS. Caracterización de los antígenos ABH en la membrana espermática humana. pp 27. Bahnhofstrasse 28, 66111 Saarbrücken (Alemania): Ed.Publicia; 2016.
- Kumar N, Singh AK. Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2018; 47(10):565-57.
- Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol*. 2011; 66(Suppl 1):11-22.
- Samanta L, Parida R, Dias TR, Agarwal A. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018; 16(1):41.
- Zylbersztejn DS, Andreoni C, Del Giudice PT, Spaine DM, Borsari L, Souza, GHMF, et al. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril*. 2013; 99(1):92-98.
- Martins AD, Panner Selvam MK, Agarwal A, Alves MG, Baskaran S. Alterations in seminal plasma proteomic profile in men with primary and secondary infertility. *Sci Rep*. 2020; 10(1):7539.
- Sylvester SR, Griswold MD. The testicular iron shuttle: a "nurse" function of the Sertoli cells. *J Androl*. 1994; 15(5):381-5.
- Fujisawa M. Regulation of testicular function by cell-to-cell interaction. *Reprod Med Biol*. 2006; 5(1):9-17.
- Leichtmann-Bardoogo Y, Cohen LA, Weiss A, Marohn B, Schubert S, Meinhart A, et al. Compartmentalization and regulation of iron metabolism proteins protect male germ cells from iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 302(12):e1519-30.
- Agarwal A, Parekh N, Panner Selvam MK, Henkel R, Shah R, Homa ST et al. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J Mens Health*. 2019; 37(3):296-312.
- Gupta S, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. Total antioxidant capacity-Relevance, methods and clinical implications. *Andrologia*. 2021; 53(2):e13624.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed, Geneva, Switzerland. WHO Press. 2010.
- Calamera J, Doncel G, Olmedo S, Kolm P, Acosta A. Modified sperm stress test: a simple assay that predicts sperm-related abnormal in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1998; 13(9):2484-8.
- Green L, Wagner D, Glogowski J, Skipper P, Wishnok J, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126(1):131-8.
- Wade CR, van Rij AM. Plasma thiobarbituric acid reactivity: reaction conditions and the role of iron, antioxidants and lipid peroxy radicals on the quantitation of plasma lipid peroxides. *Life Sci*. 1988; 43(13):1085-93.
- Dadoun C, Guiton P, Dubuc PD, Bastit P, Sauger F, Dadoun D, Bisson JP, Maitrot B. Biochemical exploration of azoospermia: interest of the seminal transferrin assay. *Hum Reprod*. 1989; 4(3):265-9.
- Zalata, A., Hafez, T., Schoonjans, F., Comhaire, F. The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. *Human Reproduction*. 1996; 11(4):761-764.
- Yoshida KI, Nakame Y, Uchijima Y. Seminal plasma transferrin concentration in normozoospermic fertile men and oligozoospermic men associated with varicocele. *Int J Fertil*. 1988; 33(6):432-6.
- Barthelemy C, Khalfoun B, Guillaumin JM, Lecombe P, Bardos P. Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men. *J Reprod Fertil*. 1988; 82(1):113-8.
- Schlegel P, Hardy M y Goldstein M. *Fisiología Reproductiva Masculina*. En Campbell-Walsh- Urología. 9º. Ed. Buenos Aires (Argentina). Ed. Médica Panamericana. 2008. Tomo 1. Sección IV. Cap.18. p.589.
- Levy MA, Tsai YH, Reaume A, Bray TM. Cellular response of antioxidant metalloproteins in Cu/Zn SOD transgenic mice exposed to hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; 281(1):172-182.
- Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2014; 29(1):32-58.
- Krawetz SA, De Rooij DG, Hedger MP. Molecular aspects of male fertility. *International Workshop on Molecular Andrology*. EMBO Rep. 2009; 10(10):1087-92.
- Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Castagnola M, Marana R. Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology. *Mol Reprod Dev*. 2013; 80(5):350-7.