



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

*“Impacto de los cuerpos M540 en poblaciones
espermáticas evaluadas con marcadores de
apoptosis temprana y tardía en pacientes infértiles”*

TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALISTA EN:

BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

PRESENTA:
DR. MAURICIO VELÁZQUEZ MAGAÑA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO
DR. GREGORIO PÉREZ PALACIOS
ASESOR DE TESIS
DR. GERARDO BARROSO VILLA



MÉXICO, D.F.

FEBRERO

2009



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.

Índice

	paginas
I. Introducción.....	1
II. Marco Teórico.....	2
III. Planteamiento del Problema.....	4
IV. Justificación.....	4
V. Objetivo.....	4
VI. Hipótesis.....	4
VII. Materiales y Métodos.....	5
a. Tipo de Estudio	5
b. Población de Estudio y Diseño	5
c. Tamaño de la Muestra	5
d. Criterios inclusión y exclusión	5
e. Descripción del estudio	5
f. Variables	7
g. Recolección de datos	7
h. Prueba Piloto	8
i. Análisis Estadístico	8
j. Aspectos Éticos	8
VIII. Resultados.....	9
IX. Discusión.....	10
X. Conclusiones.....	11
XI. Anexos.....	12
a. Figuras	12
b. Consentimiento informado	13
XII. Bibliografía.....	15

Introducción

Durante las últimas décadas se ha observado una disminución progresiva en la capacidad reproductiva tanto en hombres como mujeres.

Esto ha traído consigo un incremento en la demanda de los servicios asistenciales para la atención de los problemas reproductivos relacionados con la infertilidad.

La infertilidad se define como la incapacidad de lograr un embarazo después de un año de búsqueda intencionada y sin el uso de algún método anticonceptivo, sin embargo hay condiciones que requieren una atención oportuna sin que necesariamente se definan los tiempos en el proceso de evaluación diagnóstica y proyección terapéutica.

El espermatozoide ha jugado un papel importante en los procesos reproductivos en donde sus capacidades están relacionadas no solo con los procesos de fertilización y desarrollo embrionario, sino también con los fenómenos de placentación y aquellos relacionados con procesos restrictivos derivados de la vasculogénesis, transporte y nutrición placentaria (enfermedad hipertensiva asociada al embarazo, restricción en el crecimiento intrauterino, entre otras).

Los procesos de muerte celular programada también llamados apoptosis se caracterizan por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan en la eliminación de las células sin la presencia de una respuesta inflamatoria^{i,ii}. Al igual que en diferentes procesos tanto fisiológicos como patológicos los procesos reproductivos no son ajenos a estas vías de activación, los cuales repercutirán en la capacidad reproductiva tanto en el hombre como en la mujer.

Para una fertilización exitosa se requiere que la membrana plasmática del espermatozoide se encuentre íntegra y funcionalⁱⁱⁱ. Dentro de las funciones de la membrana celular se encuentra el metabolismo celular para mantener la motilidad espermática, durante el proceso de capacitación, reacción acrosómica y durante la interacción con el gameto femenino^{iv}.

Durante las fases tempranas del daño en la integridad de la membrana del espermatozoide ocurre una pérdida en la simetría en los fosfolípidos de membrana secundario a la translocación de la fosfatidilserina de la capa interna a la externa^v. Siendo este evento característico del inicio de la apoptosis celular^{vi}.

Otra característica importante durante la apoptosis es la fragmentación del ADN. Este proceso ocurre en las últimas etapas en la apoptosis y es secundario a la activación de las endonucleasas endógenas^{vii}.

En los últimos años, se ha mostrado un interés particular por descubrir la participación de la apoptosis durante la espermatogénesis, y se ha observado que es un mecanismo importante en el desarrollo del espermatozoide^{viii,ix}. Además, se ha demostrado que las alteraciones en los procesos apoptóticos se asocian con infertilidad masculina^{x,xi}.

Existe una correlación negativa y significativa entre la presencia de apoptosis en espermatozoides maduros y la calidad del semen^{xii}. Por lo tanto se ha sugerido que la identificación de marcadores apoptóticos, puede ser un factor importante para la evaluación de la calidad seminal^{xiii}.

Resumen

Objetivo: Evaluar la presencia de los cuerpos M540 como marcadores de falsa positividad de apoptosis, cuando se compara con indicadores de muerte celular programada tardía en muestras seminales de pacientes infértiles y controles.

Material y Métodos: Se evaluaron 22 sujetos, donde las muestras seminales fueron recolectadas después de 3 a 5 días de abstinencia sexual. Las muestras se evaluaron de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999). Se trabajo con muestras seminales sin procesar y se evaluó la presencia de anexina V, cuerpos apoptóticos M540, y la fragmentación de ADN por medio del método del TUNEL. Los marcadores antes mencionados se identificaron utilizando anticuerpos específicos y fueron analizados mediante citometría de flujo.

Resultados: La media de edad fue de 32.2 ± 1.8 años en el grupo control y de 31.4 ± 2.5 años en los pacientes infértiles. La expresión de los cuerpos M540 en el grupo control fue de $0.93 \pm 1.10\%$ y en los pacientes infértiles fue de $0.25 \pm 0.18\%$ $P=0.10$. La fragmentación del ADN determinada con el método de TUNEL empleando el IP para descartar los M540 en las muestras seminales del grupo control fue de $16.3 \pm 11.1\%$ (rango 4.3-35.2%) y en los pacientes infértiles fue de $36.3 \pm 17.3\%$ (rango 5-58.1%) $P=0.01$. La contribución de los cuerpos M540 en la aplicación del método de TUNEL en el grupo control ($P=0.5$) como en los infértiles no es significativa ($P=0.7$)

Conclusiones: Nuestro estudio piloto demostró que los cuerpos M540 no afectan la determinación de la fragmentación espermática en muestras seminales a través del método de TUNEL acoplado al citómetro de flujo.

Planteamiento del problema

Hasta hoy, todos los estudios en fragmentación del ADN en los espermatozoides en muestras seminales no procesadas, incluyen en su análisis los cuerpos M540.

La evaluación de los cuerpos M540 de manera simultánea con diferentes marcadores apoptóticos (tempranos y tardíos) como anexina V y fragmentación de ADN por medio del método de TUNEL, nos permitirá evaluar el impacto de estos cuerpos como marcadores de falsa positividad de apoptosis tardía en muestras seminales de pacientes infértiles.

Marco Teórico

El semen humano es un fluido biológico complejo en el cual están presentes diferentes tipos celulares, incluyendo células germinales en diferentes grados de maduración (además de los espermatozoides maduros) y células somáticasⁱ.

Durante la espermatogénesis, la apoptosis afecta a cerca del 75% de la población de espermatozoidesⁱⁱ. Esta apoptosis selectiva de las células germinales tempranas, evita su sobreproliferación y elimina las formas espermáticas anormalesⁱⁱⁱ.

La presencia de células apoptóticas en el semen puede ser secundario a una apoptosis fallida que refleja una alteración en el mecanismo de eliminación durante la espermatogénesis^{iv} siendo esto característico en enfermedades sistémicas o testiculares^v y en pacientes con infertilidad^{vi}.

Durante la apoptosis, el ADN cromosómico se fragmenta como resultado de la ruptura entre los nucleosomas. La cromatina se condensa y entonces el núcleo se rompe en pequeños fragmentos. Por último la célula se encoge y se rompe en fragmentos rodeados por membrana denominados cuerpos apoptóticos. Las células apoptóticas y estos fragmentos celulares son reconocidos y fagocitados por macrófagos o células adyacentes^{vii}.

Dentro de los métodos de detección temprana de apoptosis se encuentra la identificación de la fosfatidilserina (FS), cuya molécula se trasloca del interior al exterior de la membrana celular, indicando el inicio de la apoptosis. La anexina V es una proteína que muestra afinidad por fosfolípidos dependiente de calcio, como la FS. Así pues, mediante la adición de anexina V se determina el comienzo del proceso apoptótico^{viii},^{ix}. La unión de anexina V a células apoptóticas se detecta a través de una tinción verde fluorescente con isotiocianato de fluoresceína (FITC), señal que se detecta mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia. Acoplado a esta técnica, se adiciona el yoduro de propidio (IP) para una tinción roja que diferencia las células necróticas de las viables con o sin translocación de fosfatidilserina.

Dentro de los eventos tardíos y más representativos de la casada apoptótica, es la activación de las endonucleasas endógenas que generaran fragmentación de ADN y por lo tanto, una multitud de grupos 3'hidroxilo. El método de TUNEL identifica a las células apoptóticas marcando las terminales 3'hidroxilo con nucleótidos de desoxiuridina trifosfato con algún compuesto como fluoresceína (FITC-dUTP)^x. La enzima terminal dexosinucleotidil transferasa (TdT) cataliza la adición independiente de (FITC-dUTP) a las terminales 3'hidroxilo del ADN, por lo que en las células apoptóticas un número sustancial de estos sitios se encuentran disponibles para su identificación mediante citometría de flujo. Acoplado a esta técnica, se adiciona el yoduro de propidio (IP) para una tinción roja que diferencia las células nucleadas de las que no lo son.

Recientemente se han identificado en el semen humano, cuerpos de forma redonda con diferentes tamaños y densidades a los cuales se les han denominado cuerpos M540^{xi}, debido a que se tiñen con el fluorocromo merocianina 540. La merocianina 540 es un compuesto lipofílico, que es sensible a los cambios en la arquitectura de la membrana tal y como ocurre

durante la apoptosis en células somáticas^{xii}, y en la capacitación espermática de algunos mamíferos^{xiii}, pero no del ser humano^{iii,xiv}.

La membrana de los cuerpos M540 se caracteriza por tener un empaquetamiento diferente al que normalmente presentan las células^{xi} y al no teñirse con IP sugiere que no tienen cromatina^{xvi}.

Los cuerpos M540 se caracterizan por carecer o presentar en pequeñas cantidades ADN con intensiva fragmentación (secundario a la segmentación del núcleo y a la actividad de las nucleasas)^{xi}.

Se ha identificado que expresan marcadores apoptóticos que ocurren durante la apoptosis testicular tales como actividad de caspasas, receptor Fas, p53, Bcl-x^{xiv}, fragmentación del ADN y también presentan ubiquitinización^{xi}. La actividad de caspasas se ha detectado en gran porcentaje de los cuerpos M540, mientras que los otros marcadores apoptóticos se presentan tan solo en una fracción de ellos. Este hallazgo parece indicar, que la actividad de las caspasas es el paso final del proceso en el cual todas las diferentes señalizaciones de las vías apoptóticas convergen.

Su origen no ha sido bien definido, pero se ha propuesto que podieran ser remanentes citoplasmáticos desprendidos del esperma. Sin embargo, los cuerpos apoptóticos también podrían derivar de otros tipos celulares que se encuentran en apoptosis en el tracto genital masculino, tales como células del epidídimo o de los conductos eyaculadores^{xv}.

Recientemente se ha descrito que la expresión de los cuerpos M540 se encuentra incrementada en pacientes con alteraciones seminales^{xvi}.

Bajo esta visión, los niveles altos de los cuerpos apoptóticos encontrados en el semen de pacientes podrían indicar la apoptosis excesiva o desregulada en el compartimiento genital masculino, particularmente a nivel testicular.

Objetivos

Objetivo General:

Definir la aportación de los cuerpos M540 como marcadores de falsa positividad de apoptosis en poblaciones espermáticas de pacientes infértiles al compararlos con el marcador específico de muerte celular tardía.

Objetivos Específicos:

Identificar el número de células positivas para marcadores apoptóticos tempranos empleando anexina V y marcadores tardíos identificando la fragmentación del ADN por medio del método de TUNEL en muestras seminales sin procesar de pacientes con fertilidad probada.

Identificar el número de cuerpos M540 en muestras seminales sin procesar de pacientes con fertilidad probada.

Comparar si la presencia de los cuerpos M540 pudieran influir como marcadores de falsa positividad en muestras seminales sin procesar que previamente han sido valoradas con el marcador tardío de muerte celular programada.

Hipótesis:

La expresión de cuerpos M540 pueden alterar la determinación del marcador apoptótico tardío en muestras seminales sin procesar de pacientes infértiles.

Justificación

Los procesos de muerte celular programada en los gametos han estado relacionados directamente con la capacidad reproductiva en el ser humano.

Se han descrito la presencia de cuerpos de forma redonda con diferentes tamaños y densidades a los cuales se les han denominado cuerpos M540 que pueden actuar como marcadores de falsa positividad en la búsqueda intencionada de indicadores apoptóticos relacionados con la funcionalidad espermática.

De tal forma que el objetivo de este estudio es cuantificar la aportación de estos cuerpos M540 en la estimación de los procesos de muerte celular programada en espermatozoides de pacientes masculinos infértiles.

Materiales y Métodos

a. Tipo de estudio

Observacional, transversal, descriptivo.

b. Población de estudio y diseño

Universo: Varones fértiles con paternidad comprobada que acuden al servicio de Infertilidad y varones infértiles que acuden al servicio de Andrología del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

c. Tamaño de la Muestra:

El número de pacientes requeridos se calculará mediante los primeros resultados obtenidos debido a que no existe ningún estudio previo que analice mediante la misma técnica los distintos marcadores apoptóticos que se evaluarán en este proyecto.

d. Criterios de Inclusión y Exclusión:

Inclusión:

- Pacientes donadores que autoricen su participación y firmen el consentimiento informado.
- Los pacientes deben demostrar embarazo de la pareja en un periodo menor a un año.
- Espermocultivo negativo
- Muestra seminal con cuenta leucocitaria menor a 1×10^6 /ml.

Exclusión:

- Pacientes con trastornos eyaculatorios.
- Pacientes con eyaculación retrógrada.
- Pacientes con menos de 3 días y más de 6 días de abstinencia sexual.
- Pacientes que se encuentran con medicación sistémica.
- Pacientes con enfermedad sistémica.
- Pacientes con toxicomanías.

e. Descripción del estudio

Unidades de Observación: Motilidad, morfología y concentración espermáticas. Células positivas para marcador apoptótico temprano (anexina V) y tardío (fragmentación del ADN por medio del método de TUNEL). Identificación de cuerpos M540.

Evaluación de movilidad, concentración y morfología espermática.

Los pacientes colectaron una muestra de semen en un contenedor estéril por masturbación después de 3 a 5 días de abstinencia sexual. Se evaluaron la concentración espermática, la motilidad y morfología en la muestras¹.

Después de licuefacción (30-45 minutos), 5 ml de cada muestra se colocaron en una cámara de Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) y se leyeron bajo el microscopio de luz para motilidad y concentración espermática.

La morfología se evaluó de acuerdo a los criterios estrictos de Krugerⁱⁱ. Para ello, cada muestra (10ml) se extendió en un portaobjetos y se dejó secar por 20 minutos después de la tinción Diff-Quick (Baxter Dade Diagnostics, Dubingen, Switzerland), leyendo un promedio de 100 espermatozoides por extendido bajo microscopía de luz en objetivo de inmersión 100X.

Una vez clasificadas las muestras de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999) las muestras de semen se lavaron en dos ocasiones empleando medio HTF (fluido tubárico humano, Irvine Scientific, Santa Ana, CA) adicionado con 10% de suplemento sérico y posteriormente se fijaron con paraformaldehído (200 µL, 4% PBS pH 7.4) por 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente las muestras fueron analizadas independientemente para la determinación de los cuerpos M540, anexina V y fragmentación del ADN a través del método de TUNEL en la siguiente media hora.

Evaluación de externalización de fosfatidilserina con anexina-V:

La anexina V es una proteína con afinidad por fosfolípidos, dependiente de calcio y con una alta afinidad por la fosfatidilserina (FS), la cual refleja eventos apoptóticos tempranos. La unión de anexina V-FITC a células apoptóticas típicamente muestra una tinción verde fluorescente. El yoduro de propidio (tinción roja) se agrega para diferenciar células viables de las necróticas, permitiendo diferenciar las células con translocación de fosfatidilserina que están muertas y después aquellas vivas con y sin translocación de fosfatidilserina.

Después de la separación, se lavaron 1×10^6 células de cada muestra en PBS (buffer de solución salina fosfatada) y se centrifugaron las muestras a 200 x g por 5 minutos.

Las muestras fueron resuspendidas en 100 µl de una solución que contenía anexina-V marcada con fluoresceína además de IP (la solución se preparó prediluyendo 20µ de anexina-V-fluoresceína en 1 ml del buffer de incubación adicionando 20µ de la solución de IP) y se incubó por 10-15 minutos a una temperatura de 15-25 °C.

Finalmente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo en 0.5 ml de un buffer de incubación. En el citómetro de flujo, las muestras se analizaron a 488nm con un filtro de 515nm para la detección de anexina-V.

Evaluación de la fragmentación del ADN mediante el método de TUNEL:

Para realizar el método de TUNEL se requirieron de dos etapas (fijación y tinción) empleando el kit APO-DIRECT.

Fijación: Se comienza el procedimiento al resuspender las células en PBS-paraformaldehído 1% a una concentración de $1-2 \times 10^6$ células/ml y colocando la suspensión celular en hielo por 60 min. Después, se centrifugaron las células durante 5 min. a 300 x g y se desechó el sobrenadante. A continuación, se lavaron las células en 5 ml. de PBS y se centrifugaron para obtener el paquete celular (este paso se realizó en dos ocasiones). Posteriormente se resuspendió el paquete celular en el PBS residual mediante agitación moderada en vortex. Se ajustó la concentración

celular a $1-2 \times 10^6$ células/ml. en etanol al 70% (v/v) frío y se mantendrá por un mínimo de 30 min. Finalmente, se almacenaron las células en etanol al 70% (v/v) a -20°C hasta su uso.

Tinción y Análisis. Se tomo la alícuota de la suspensión a estudiar (aprox. 1×10^6 células/1 ml) y se colocaron en tubos de 12 x 75 mm para citometría de flujo. Se centrifugaron a $300 \times g$ por 5 min. y se removió el etanol al 70% (V/V) por aspiración sin alterar el paquete celular. Se resuspendió cada tubo de células control con 1 ml del buffer de lavado (6548AZ), se centrifugo a $300 \times g$ por 5 min. y se removió el sobrenadante. Se repitió el tratamiento de lavado y después, se resuspendió cada paquete celular control con 50 μl de la solución de tinción (contenía el buffer de reacción para la enzima TdT, la enzima TdT, fluoresceína conjugada con dUTP [6549AZ, 6554EZ, 6555EZ] y agua destilada). Posteriormente, se incubo las células en la solución de tinción por 60-120 min. a 37°C y al finalizar el periodo de incubación se añadió 1 ml. del buffer de enjuague (0.05% Acida de Sodio 6550AZ) a cada tubo, se centrifugo a $300 \times g$ por 5 min. y se removió el sobrenadante por aspiración (en dos ocasiones). A continuación, se resuspendió el paquete celular en 0.5 ml del buffer de tinción con yoduro de propidio/RNasa (6551AZ) y se incubo las células en la oscuridad por 60-120 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se analizaron las células en la solución de yoduro de propidio/RNasa por citometría de flujo después de 3 horas de concluir con la tinción.

Evaluación de los cuerpos M540:

Se realizo la tinción con merocianina 540 por duplicado 13.5mcM y IP (25nM) en 500 mcl de HTF modificado que contiene 1mg/dl de PVP. Después las muestras se fijaron en paraformaldehído (PF, 200 mcl , 4% en PBS pH 7.4), por 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas por FACS (fluorescence-activated cell sorter). La fluorescencia correspondiente para IP (verde) y M540 (roja) se revelara empleando respectivamente el detector FL-1 (banda de longitud de onda 515-555nm) y FL-2 (banda de longitud de onda 563-607nm) del citómetro de flujo.

f. Variables del Estudio:

Independientes:

- Fertilidad.

Dependientes:

- Marcadores apoptóticos.
- Concentración, movilidad y morfología.
- Cuerpos M540.7

g. Recolección de Datos

Se obtendrán los datos mediante citometría de flujo y se reportarán los porcentajes de células positivas para el método anexina V y fragmentación del ADN mediante método de TUNEL. De igual forma, se reportarán los porcentajes de cuerpos M540.

h. Prueba Piloto

Con muestras seminales se realizaron pruebas para estandarizar el citómetro de flujo y posteriormente se analizaron los resultados obtenidos.

i. Análisis estadístico

De acuerdo los resultados obtenidos en el citómetro de flujo y al evaluar su distribución se emplearon pruebas no paramétricas (Mann-Whitney).

Se emplearon estadísticas descriptivas para caracterizar el total de la muestra en pacientes fértiles e infértiles.

Se considero un nivel de significancia estadística con un valor de P de <0.05.

Se empleo para el análisis estadístico el programa SPSS versión 12 para Windows (SPSS Inc., Chicago, III)

j. Aspectos Éticos

Los pacientes que formaron parte del protocolo de investigación firmaron un consentimiento informado y autorizaron su participación en el estudio. Los participantes recibieron asesoría. La participación de los voluntarios fue confidencial en todo momento.

ⁱ World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions, 4th Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

ⁱⁱ Kruger et al., Abnormal sperm morphology and IVF, Fertil Steril 1988; 49(1):111-117

Resultados

Se obtuvieron 22 muestras las cuales se clasificaron de acuerdo a los parámetros descritos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999). Once pacientes se encontraban dentro de los parámetros normales y los restantes presentaban las siguientes alteraciones: oligoteratozoospermia (n=1), oligoastenoteratozoospermia (n=2), astenoteratozoospermia (n=4), teratozoospermia (n=4).

La media de edad (\pm DE) fue de 32.2 ± 1.8 años en los pacientes infértiles y de 31.4 ± 2.5 años en los pacientes infértiles.

La media de la determinación de la apoptosis temprana a través del número de células positivas para anexina V en el grupo control fue de $29.9\pm 10.7\%$ (rango 0.8-26.7%) y en los pacientes infértiles fue de $31.2\pm 17.4\%$ (rango 3-56.4%) $P=0.01$. Figura 1

La expresión de los cuerpos M540 en el grupo control fue de $0.93\pm 1.10\%$ (rango 0-2.9%) y en los pacientes infértiles fue de $0.25\pm 0.18\%$ (rango 0-0.6%) $P=0.10$. Figura 1

La fragmentación del ADN determinada con el método de TUNEL en las muestras seminales en el grupo control fue de $17.2\pm 10.4\%$ (rango 4.4-35.5%) y en los pacientes infértiles fue de $36.5\pm 17.3\%$ (rango 5.6-58.4%) $P=0.01$. Figura 2

La fragmentación del ADN determinada con el método de TUNEL empleando el IP para descartar los M540 en las muestras seminales del grupo control fue de $16.3\pm 11.1\%$ (rango 4.3-35.2%) y en los pacientes infértiles fue de $36.3\pm 17.3\%$ (rango 5-58.1%) $P=0.01$. Figura 2

La contribución de los cuerpos M540 en la aplicación del método de TUNEL en el grupo control ($P=0.5$) como en los infértiles no es significativa ($P=0.7$)

Discusión

La prueba de TUNEL se emplea con mucha frecuencia para evaluar la fragmentación de ADN en los espermatozoides. Una de sus principales ventajas es que también puede acoplarse al citómetro de flujo y de esta forma evaluar de forma rápida y objetiva una gran cantidad de eventos. Sin embargo la capacidad del citómetro de flujo esta en función de la definición correcta de la población en interés. En estudios previos se ha demostrado que no es suficiente y preciso descartar detritos u otras células de mayor tamaño para evaluar la fragmentación del ADN en las muestras seminales.

En el presente estudio piloto empleamos una doble tinción (TUNEL+IP) para poder identificar a los cuerpos M540 de los espermatozoides y de esta forma evaluar su impacto al emplear marcadores de apoptosis tardía encontrando que no había diferencias significativas en los porcentajes de las células positivas para TUNEL y las células positivas para TUNEL+IP contrario a lo reportado por Muratori y colaboradores.

De acuerdo con lo antes descrito la cantidad de células positivas para los marcadores de apoptosis temprana (anexina V) y tardía (fragmentación de ADN) muestran diferencias significativas al comparar las muestras seminales con los controles.

Aun no se ha definido el origen de la fragmentación ADN en los espermatozoides, pero se ha propuesto que se deba a una falla en la conclusión de la apoptosis en las células germinalesⁱ, alteración en el empaquetamiento de la cromatina espermática durante la espermiogénesisⁱⁱ o secundario al estrés oxidativo.

Algunos autores (Lewis, 2007; Erenpreiss y colaboradores, 2006) han propuesto la determinación de la fragmentación del ADN como un parámetro adecuado para determinar el futuro reproductivo en paciente que ya han sido valorados previamente con una espermatobioscopia directa (OMS, 1999)^{iii,iv}.

Otros estudios que emplearon técnicas similares a la nuestra (TUNEL acoplado al citómetro de flujo en muestras seminales sin procesar) han reportado datos discrepantes, Varum y colaboradores^v encontraron una asociación negativa entre la calidad del semen y el porcentaje de células positivas para TUNEL, mientras que Sepaniak y colaboradores^{vi} encontraron que el grado en la fragmentación del ADN en los espermatozoides no correlacionaba con los parámetros seminales, mientras que Oosterhuis y colaboradores^{vii} solo lo correlacionaron con la concentración espermática.

El resultado de los estudios enfocados en establecer si existe relación entre la fragmentación del ADN y los resultados en las técnicas de reproducción asistida no son concluyentes. El hecho es que aun no sabemos si la cantidad de la fragmentación del ADN tenga impacto en la fertilización, desarrollo embrionario y las tasas de embarazo.

Conclusiones

En conclusión nuestro estudio piloto demostró que los cuerpos M540 no afectan la determinación de fragmentación espermática en muestras seminales sin procesar evaluadas a través del método de TUNEL acoplado al citómetro de flujo en pacientes infértiles.

Anexos

Figura 1

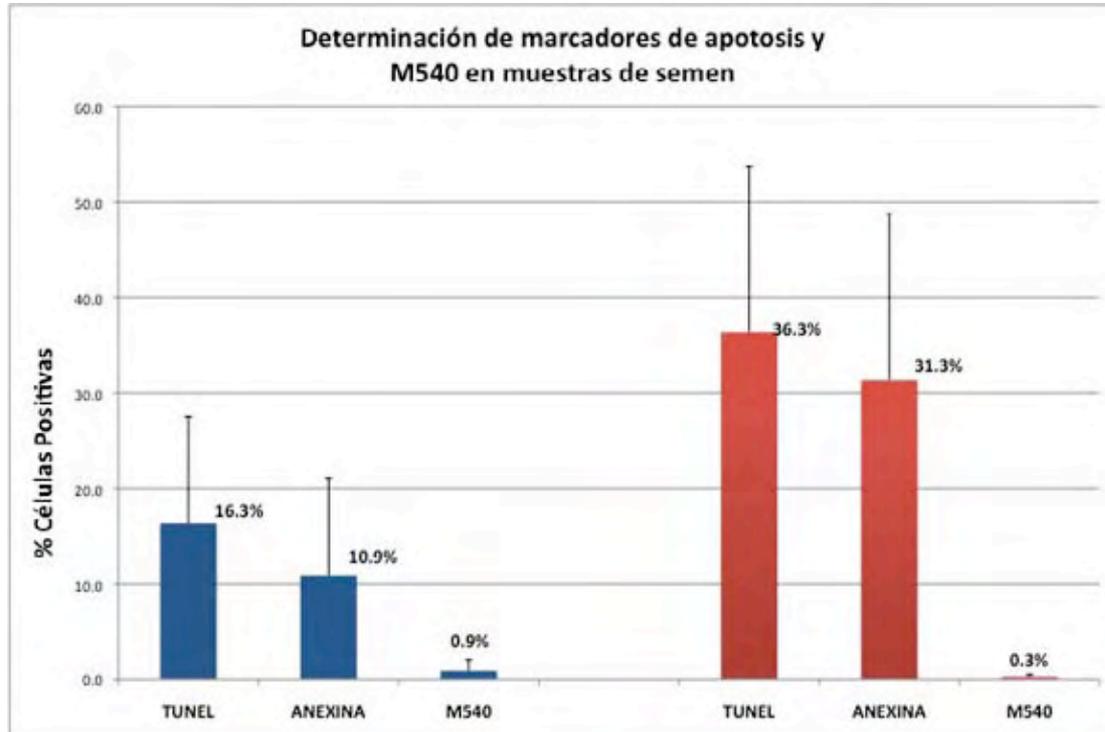
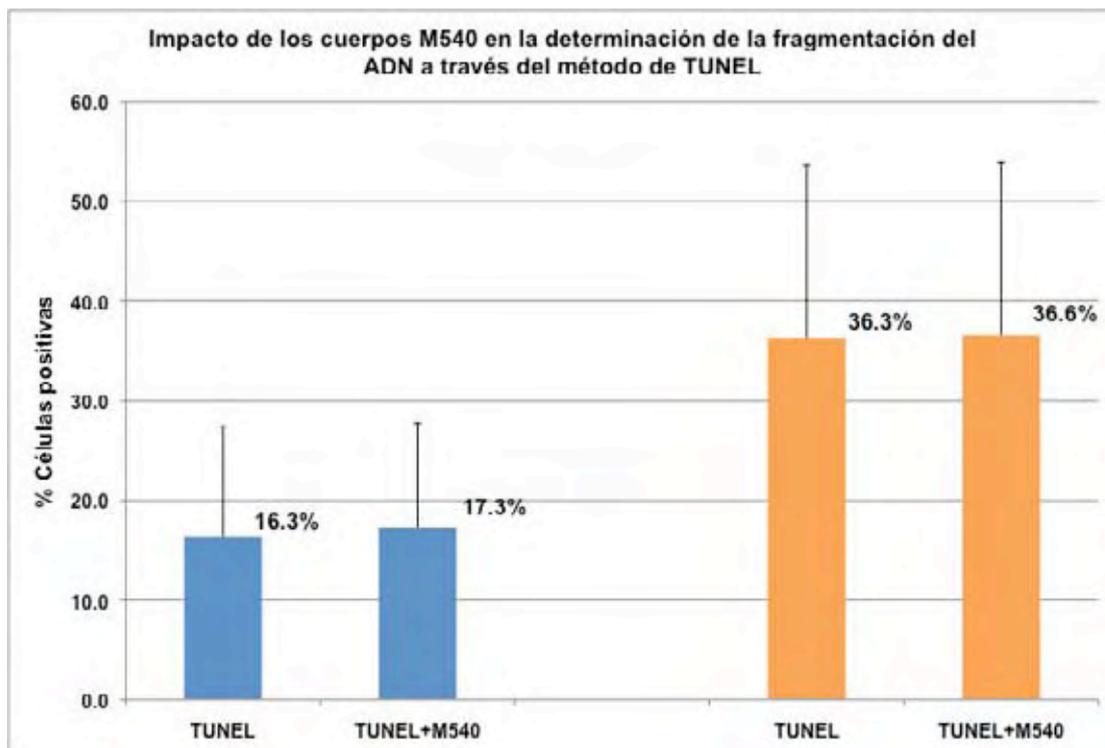


Figura 2



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES (INPerIER)
SUBDIRECCIÓN DE MEDICINA REPRODUCTIVA, DIRECCIÓN DE
INVESTIGACIÓN
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: “Impacto de los cuerpos M540 en poblaciones espermáticas evaluadas con marcadores de apoptosis temprana y tardía en pacientes infértiles”.

Responsable: Dr. Gerardo Barroso Villa Subdirector de Medicina Reproductiva, Instituto Nacional de Perinatología, Teléfono 55209900 ext 239.

Invitación de Participación:

Se le invita a participar en un estudio de investigación realizado por el INPer.

PROPÓSITO: El propósito de este estudio es analizar en la muestra seminal de los espermatozoides la presencia de marcadores de apoptosis. Durante esta investigación requeriremos la donación de una muestra seminal que nos permita identificar la calidad de la misma y contar con datos que eventualmente podrían ayudar al diagnóstico oportuno de infertilidad.

METODOLOGÍA: Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, se le pedirá una muestra seminal. Este estudio es solicitado regularmente por los especialistas de Biología de la Reproducción. Este estudio se realiza en forma cotidiana en el protocolo de toda pareja infértil que está buscando embarazo.

RIESGOS: La obtención de la muestra seminal es de uso rutinario en las instituciones como el INPer IER y no representa riesgo alguno para el hombre ni su capacidad de fertilidad.

BENEFICIOS: No existe beneficio directo para usted, pero su participación podrá dar resultados favorables a otros pacientes vistos en el futuro en nuestra institución.

COSTOS FINANCIEROS: Todos los estudios mencionados arriba se harán sin costo alguno para usted y serán utilizados por su médico tratante para orientar su manejo en el Instituto y en su caso, para el seguimiento normal del manejo de la pareja infértil. Independientemente de que decida o no participar en el estudio, usted deberá cubrir el resto de los procedimientos relacionados con el programa de estudio de la pareja infértil en el INPer IER, como cualquier otro paciente perteneciente al instituto.

ALTERNATIVAS: Si usted decide no participar en el estudio, su atención médica no se verá afectada de ninguna manera.

COMPENSACIÓN: Si usted decide participar en el estudio, le notificamos que no existirá ningún tipo de compensación extra por su participación

CONFIDENCIALIDAD: Se intentará mantener toda la información obtenida en este estudio estrictamente confidencial, excepto la requerida por la ley. Una vez publicados los resultados del estudio, su nombre no será mencionado.

INFORMACIÓN ADICIONAL: Cualquier información que se identifique durante el estudio y que perjudique su bienestar, le será informado de inmediato.

ABANDONO DEL ESTUDIO: Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y es muy importante que sepa que podrá negarse a participar, sin que esto afecte su atención médica presente o futura en el INPer.

LESIONES / COMPLICACIONES: Este tipo de estudio no se ha relacionado con la presencia de lesiones o complicaciones por la forma en que se lleva a cabo.

DERECHOS DEL SUJETO: Si usted requiere obtener mayor información acerca de sus derechos como sujeto de investigación, puede al médico responsable a los teléfonos que aparecen en la primera página. Tenga en cuenta que usted tiene la

oportunidad de hacer cualquier pregunta relacionada con el estudio y que ésta le sea contestada a su entera satisfacción.

DESTINO DE LAS MUESTRAS: Las muestras analizadas serán desechadas a los recipientes biológicos y no serán utilizadas para ningún otro fin que no sea el de la investigación del protocolo en cuestión.

CONCLUSIONES: 1) Usted ha leído y entendido la presente forma de consentimiento informado. 2) Usted está de acuerdo en participar en este estudio de investigación. 3) Al firmar usted recibirá una copia de esta carta.

***Nota:** Los testigos no deben tener ninguna relación con el paciente y deben informar y reportar sus datos generales al momento de firmar.

Nombre y firma de la paciente / fecha / hora.

Testigo 1*

Nombre y Firma/fecha/hora

Dirección

Testigo 2*

Nombre y Firma/fecha/hora

Dirección

Nombre y firma de la persona que obtiene el consentimiento / fecha / hora

Bibliografía

- ¹ Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239–57
- ² Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556
- ³ Flesch FM and Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469:197–235
- ⁴ Cross NL and Hanks SE. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Hum Reprod* 1991;6:1279–1283
- ⁵ Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39–51
- ⁶ Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM and Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182:1545–1556
- ⁷ Oosterhuis GJE, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa. a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000;74:245-250
- ⁸ Print, C.G. and Loveland, K.L. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000;22:423-430
- ⁹ Kierzenbaum, A.L. Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive. *Mo. Reprod. Dev* 2001;58:1-3
- ¹⁰ Lin, W.W., Lamb, D.J., Wheeler, T.M., Lipshultz, L.L and Kim, E.D. In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997;68:1065-1069
- ¹¹ Sinha Hikim, A.P., Wang, c., Lue, Y., Johnson, L., Wang, X.H. and Swerdloff, R.S. Spontaneous germ cell apoptosis in human: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1998;83:152-156
- ¹² Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28:587–96
- ¹³ Han-Ming S., Jun D., Sin-Eng C., Alvin L., Choon-Nam O. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality, *Human Reproduction* 2002; 17, 5: 1266-1273
- ¹⁴ O'Brien J., Zini, A. Sperm dna integrity and male infertility. *Urology* 2005; 65:16-22.
- ¹⁵ Sinha Hikin AP, and Swerdloff RS: Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999;4: 38–47
- ¹⁶ Martin G., Sabido, O., Durand P., Levy, R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 2002;3459-3468
- ¹⁷ Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W and Bizzaro D. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Hum Fertil (Camb)* 2004;7:99–103

- ¹⁸ Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Pondero F. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;5:830-839
- ¹⁹ Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002; 17:1266-1273
- ²⁰ Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-2026
- ²¹ Barroso, G., Morshedi, M. and Oehninger, S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1338-1344
- ²² Oosterhuis, G., Mulder, A.B., Kalsbeek-Batenburg, E., Lamblak, C.B., Schoemaker, J. and Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000;74:245-250
- ²³ Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A., Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501
- ²⁴ Marchiani S, Tamburrino L, Maoggi A, Vannelli G, Forti G, Balde E, Muratori M. Characterization of m540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies. *Molecular Human Reproduction* 2007;13(9):621-631
- ²⁵ Aussel C, Bernard G, Breittmayer JP, Pelassy C, Zoccola D, Bernard A. Monoclonal antibodies directed against the E2 protein (MIC2 gene product) induce exposure of phosphatidylserine at the thymocyte cell surface. *Biochemistry* 1993;32:10096-10101
- ²⁶ Rahi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in Vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 2001;65:462-470
- ²⁷ Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Balde E. Annexin V binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl* 2004; 25:797-810
- ²⁸ Muratori M, Marchiani S, Forti G, Balde E. Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen. *Hum Reprod* 2005;20(4):1035-1043
- ²⁹ Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, Baldi E. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *Hum Reprod* 2008;23(5):1035-1043
- ³⁰ World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions, 4th Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- ³¹ Kruger et al., Abnormal sperm morphology and IVF, *Fertil Steril* 1988; 49(1):111-117
- ³² Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31-37
- ³³ Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 2004;70:910-918
- ³⁴ Lewis SE. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* 2007;134:31-40

³⁵ Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwereman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006;8:11-29

³⁶ Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS. Characterization of human sperm population using conventional parameters, surface ubiquitination and apoptotic markers. *Fert Steril* 2007;87:572-583

³⁷ Sepanaik S, Forges T, Gerad H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006;223:54-60

³⁸ Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fert Steril* 2000;74:245-250