



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**Instituto Nacional de Perinatología**

**Isidro Espinosa de los Reyes**

**Subdirección de Biología de la Reproducción**

**“Impacto de la edad en la determinación de marcadores de  
apoptosis en el espermatozoide humano”**

**Tesis**

**Que para obtener el título de especialista en:**

**Biología de la Reproducción Humana**

**ALINNE GUADALUPE COLIN VALEZUELA**

**PRESENTA**

**DR. FERNANDO GAVIÑO GAVIÑO**

**PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION**

**DR. GERARDO BARROSO VILLA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**MEXICO, D. F. FEBRERO 2011**





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.

# AUTORIZACION DE TESIS

TITULO DE TESIS

“Impacto de la edad en la determinación de marcadores de apoptosis en el  
espermatozoide humano ”

DR. CARLOS RAMIREZ ISARRARAZ

SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA Y GESTION EDUCATIVA

---

DR. FERNANDO GAVIÑO GAVIÑO

PROFESOR TITULAR DEL CURSO

---

DR. GERARDO BARROSO VILLA

DIRECTOR DE TESIS

---

**AGRADECIMIENTOS:**

**A todos los hombres que hicieron posible este estudio.**

## INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	MARCO TEÓRICO.....	3
4.	OBJETIVOS.....	6
5.	HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	6
6.	JUSTIFICACIÓN.....	6
7.	MÉTODO DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA.....	8
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PROPUESTO.....	11
9.	ASPECTOS ÉTICOS.....	11
10.	RECOLECCIÓN DE DATOS.....	11
11.	RESULTADOS.....	12
12.	DISCUSIÓN.....	16
13.	CONCLUSIONES.....	18
14.	ANEXOS.....	19
15.	REFERENCIAS.....	24

## 1. RESUMEN

---

### **Introducción**

Es conocida la importancia de la apoptosis durante la espermatogénesis, sin embargo su significancia biológica en el espermatozoide eyaculado no está clara y no se conoce el comportamiento de los marcadores de apoptosis en relación a la edad del sujeto.

### **Objetivo**

Evaluar la presencia de indicadores apoptóticos en espermatozoides provenientes de sujetos fértiles en diferentes décadas de la vida.

### **Metodología**

Se realizó un estudio prospectivo, transversal, analítico; incluyéndose muestras seminales de 25 sujetos sanos de 20 a 70 años de edad, agrupados por décadas, los parámetros seminales se analizarán de acuerdo a los parámetros de la OMS (1999), acotándose mediante los lineamientos de Tygerberg. Los procesos de transformación biomolecular de membrana y la expresión por oligonucleosomas en la cascada terminal de apoptosis serán cuantificados por medio de citometría de flujo utilizándose láser de argón como fuente de lectura a 480nm, discriminando los grados de celularidad tanto negativa como positiva para cada uno de los indicadores.

### **Resultados**

El porcentaje de células vivas con traslocación de fosfatidil serina a nivel membrana (Anexina-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) fue significativamente superior conforme se incrementa la edad del sujeto (ANOVA, P= .01). Estos hallazgos se enriquecen con la obtención de una correlación positiva y significativa (r= 0.50, P< 0.008), entre el biomarcador temprano y la edad de los sujetos. Respecto a la fragmentación del ADN a pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas, se observó una tendencia clara en el aumento de esta en los grupos mayor edad (r=0.51).

### **Conclusiones**

El incremento en la edad del hombre se asocia con un aumento en la expresión de marcadores de apoptosis, lo cual queda evidenciado por una mayor expresión de la traslocación de fosfatidil serina a nivel membranal. De igual forma este estudio confirma que la edad del sujeto se asocia con un declive en la concentración y movilidad espermática.

**Palabras clave:** espermatozoide, semen, apoptosis, anexina V, TUNEL, fragmentación del ADN.

## 2. ABSTRACT

---

### ***Objective***

To evaluate the impact of age on the expression of apoptotic biomarkers in human spermatozoa.

### ***Design***

Cross-sectional, prospective study.

### ***Materials and methods***

Healthy volunteers with proven fertility (n=25), stratified by age (range: 20 to 70 years). Were subjected to examination of basic semen parameters, and assessment of early (plasma membrane translocation of phosphatidylserine [PS]) and late (DNA fragmentation) sperm apoptotic markers by flow cytometry (using Annexin-V binding and Terminal-deoxynucleotidyl-transferase mediated deoxyuridine triphosphate fluorescence nick end labeling, TUNEL, respectively). Main outcome measure: expression of apoptotic markers.

### ***Results***

The percentage of live sperm cells with plasma membrane translocation of PS (Annexin-V+/PI+) were significantly higher with advancing age (ANOVA, P= .01). This significant association was further supported by a significant and positive correlation among these two parameters (r= 0.50, P< 0.008). Although not significant, there was a clear trend for increased DNA fragmentation in the older groups (r=0.51).

### ***Conclusions***

Advancing male age is associated with the expression of early apoptotic markers as evidenced by significantly increased plasma membrane translocation of PS, as well as with a more subtle proportion of sperm carrying DNA fragmentation. This study confirmed that male age is also associated with a decline in sperm concentration and motility.

### 3. MARCO TEÓRICO.

---

Los procesos de muerte celular programada ó apoptosis, se caracterizan por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan en la degradación celular sin la presencia de una respuesta inflamatoria.<sup>1,2</sup> Al igual que en otros procesos tanto fisiológicos como patológicos los procesos reproductivos no son ajenos a estas vías de activación, lo cual repercutirá en la capacidad reproductiva de hombres y mujeres.

En los últimos años, se ha mostrado un interés en la participación de estos procesos apoptóticos durante la espermatogénesis y en el desarrollo espermático tardío lo cual repercutirá en la capacidad reproductiva final.<sup>3,4</sup> Por otro lado, se ha demostrado que las alteraciones en los procesos apoptóticos se asocian con infertilidad masculina, con una elevada frecuencia de apoptosis en células germinales de tejido testicular en pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa.<sup>5,6</sup>

También se ha estudiado su participación en el espermatozoide maduro y por tanto, en la calidad del semen eyaculado<sup>7</sup>, correlacionándose la activación de mecanismos apoptóticos con la calidad del semen<sup>8</sup>, lo que sugiere que, la identificación de marcadores apoptóticos, puede ser un factor importante para la evaluación de la calidad seminal.

Para evaluar la expresión de apoptosis en el espermatozoide existen diferentes técnicas, clasificándose en aquellas que detectan el proceso apoptótico en etapas tempranas y aquellos que lo detectan en etapas tardías. Dentro de los métodos de detección temprana de apoptosis se encuentra la identificación de la fosfatidilserina (FS) en la capa externa de la membrana celular mediante la adición de anexina V, que es una proteína que muestra afinidad por fosfolípidos dependiente de calcio, con alta afinidad por la FS, de modo tal que, esta proteína nos indica el comienzo del proceso apoptótico.<sup>9,10</sup> La unión de anexina V a células apoptóticas puede detectarse por una tinción verde fluorescente con isotiocianato de fluoresceína (FITC) que puede detectarse mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescente. 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.

Otra forma de detectar el proceso de apoptosis en etapas tempranas es mediante la detección de proteasas específicas de cisteína-aspartato ó también llamadas caspasas<sup>11</sup>. Las caspasas participan como transductores y efectores tempranos en las diferentes vías apoptóticas en células somáticas<sup>12</sup>, por lo que su detección mediante anticuerpos monoclonales, indica el comienzo del



proceso de muerte celular programada en forma muy inicial. Las caspasas desempeñan un papel crucial en la transducción de señales intracelulares en las células que son destinadas a la muerte programada<sup>13</sup> y su activación ocurre por proteólisis y/o el resultado de la acción de otras proteínas.<sup>14</sup> La unión de Fas- ligando en la membrana celular y un incremento de Bax/Bcl2 en la membrana mitocondrial dan inicio a la activación de las caspasas 8 y 9 respectivamente.<sup>15</sup> Una vez activadas estas caspasas la señal se transduce a las caspasas efectoras, incluyendo las caspasas 3, 6 y 7.<sup>15</sup> Estas enzimas causan degradación de los sustratos celulares, incluyendo las proteínas estructurales citoplasmáticas como actina y citoqueratinas y/o proteínas nucleares como poli (ADP ribosa) polimerasas (PARP) y laminasas.<sup>16-19</sup> Al parecer, la caspasa 3 produce la activación de una dioxirribonucleasa (CAD, también llamada Factor-40 de fragmentación de ADN o nucleasa activada por caspasa), la cual, se encuentra involucrada en la fragmentación del ADN.<sup>20-22</sup> Por lo anterior, la determinación de la caspasa 3, mediante anticuerpos monoclonales específicos permite detectar la activación de la apoptosis.

Uno de los eventos tardíos y más representativos de la cascada apoptótica, es la activación de endonucleasas endógenas que generan fragmentación en el ADN y por lo tanto, la liberación de grupos hidroxilo 3'. Esta propiedad es utilizada por el método ya conocido de TUNEL para identificar células apoptóticas al marcar las terminales 3' hidroxilo con nucleótidos de desoxiuridina trifosfato con algún compuesto como fluoresceína (FITC-dUTP).<sup>23</sup> La enzima terminal dioxinucleotidil transferasa (TdT) cataliza la adición independiente de (FITC-dUTP) a las terminales 3' hidroxil del ADN, por lo que en células apoptóticas un número sustancial de estos sitios se encuentran disponibles para su identificación mediante el método de TUNEL.

En la estimulación de la cascada apoptótica en el espermatozoide maduro, se han asociado diferentes factores, entre los que se encuentran: la radiación, tabaquismo<sup>24</sup>, hipertermia testicular<sup>25</sup>,<sup>26</sup>, quimioterapia, radioterapia<sup>27, 28</sup>, inflamación del tracto genital<sup>29</sup> y criopreservación<sup>30,31</sup> seminal. Sin embargo, es poco lo que se conoce de la edad como un factor relacionado con el aumento en el número de células apoptóticas dentro del eyaculado.<sup>32</sup>

Respecto a los parámetros seminales, se ha observado que conforme la edad del hombre aumenta se encuentra una disminución significativa en la movilidad, morfología, concentración y volumen. Por otra parte, en lo que concierne a la búsqueda de la relación de marcadores apoptóticos con la edad, pocos han sido los estudios que se han realizado y algunos autores concluyen que esta disminuye conforme la edad.<sup>33</sup> Además, ninguno de ellos evalúa diferentes marcadores en el mismo estudio y no relacionan el nivel sérico de las diferentes hormonas relacionadas con los procesos apoptóticos.

Por lo anterior, consideramos necesario realizar un estudio que con el uso de citometría de flujo cuantifique la presencia de estos marcadores biológicos relacionados con apoptosis para definir el impacto de estos en el esquema reproductivo.

De este modo se pretende correlacionar los niveles de apoptosis con la edad y determinar si existe relación de las hormonas a evaluar con el envejecimiento de los hombres.

El efecto deletéreo del gameto masculino ha mostrado un impacto substancial en los procesos reproductivos y se ha relacionado hasta en un 50% de los casos con infertilidad.

De tal manera que, esto expresará alteraciones en la función espermática, génica y en la expresión de aneuploidías durante los procesos de fertilización. Por otro lado, existe un impacto directo en la formación y desarrollo de pronúcleos y la participación del aparato mitótico con consecuencias a corto y mediano plazo en el desarrollo embrionario<sup>43</sup>.

A pesar de la evaluación de criterios morfológicos y de funcionalidad en los parámetros seminales (OMS, 1999) existe una variabilidad acentuada en la expresión de estos resultados que no necesariamente se relacionan con las condiciones reproductivas en el individuo, y es poco conocido el efecto de la edad sobre estos parámetros seminales, por este motivo, es necesario investigar si existe un efecto deletéreo en la transmisión de enfermedades génicas y cromosómicas relacionadas con el daño progresivo del espermatozoide dado a través del tiempo y cuantificarlo por medio de marcadores apoptóticos de membrana y nucleares<sup>43</sup>.

En los últimos años diferentes investigadores han reportado decremento en los parámetros seminales de sujetos de edad avanzada. La presencia de apoptosis en espermatozoides maduros recientemente ha sido descubierta y se ha relacionado en mayor medida con pacientes infértiles. Sin embargo, su relación con la edad no ha sido descrita con exactitud además de que existe controversia en cuanto a los resultados observados. Por ello, consideramos necesario realizar un estudio en el cual se analizara mediante métodos más exactos la relación de la edad del hombre con la calidad seminal por medio del estudio apoptótico de los espermatozoides maduros.

#### **4. OBJETIVOS.**

---

##### ***Objetivo general***

Describir el comportamiento de dos marcadores biomoleculares de apoptosis en el espermatozoide, por efecto de la edad.

##### ***Objetivos específicos***

- Comparar los parámetros seminales (concentración, movilidad y morfología) con la edad en pacientes sanos con fertilidad comprobada.
- Comparar las determinaciones de dos marcadores de apoptosis en el espermatozoide de sujetos de diferentes edades.

#### **5. HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN**

---

¿El semen de pacientes sanos con fertilidad comprobada muestra una mayor cantidad de marcadores apoptóticos conforme la edad avanza?

#### **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.**

---

El efecto deletéreo del gameto masculino ha mostrado un impacto substancial en los procesos reproductivos y se ha relacionado hasta en un 50% de los casos con infertilidad.

De tal manera que, esto expresará alteraciones en la función espermática, génica y en la expresión de aneuploidías durante los procesos de fertilización.

Por otro lado, existe un impacto directo en la formación y desarrollo de pronúcleos y la participación del aparato mitótico con consecuencias a corto y mediano plazo en el desarrollo embrionario.

A pesar de la evaluación de criterios morfológicos y de funcionalidad en los parámetros seminales (OMS, 1999) existe una variabilidad acentuada en la expresión de estos resultados que no necesariamente se relacionan con las condiciones reproductivas en el individuo, y es poco conocido el efecto de la edad sobre estos parámetros seminales, por este motivo, es necesario investigar si existe un efecto deletéreo en la transmisión de enfermedades génicas y cromosómicas relacionadas con el daño progresivo del espermatozoide dado a través del tiempo y cuantificarlo por medio de marcadores apoptóticos de membrana y nucleares.

En los últimos años diferentes investigadores han reportado decremento en los parámetros seminales de sujetos de edad avanzada. La presencia de apoptosis en espermatozoides maduros recientemente ha sido descubierta y se ha relacionado en mayor medida con pacientes infértiles. Sin embargo, su relación con la edad no ha sido descrita con exactitud además de que existe controversia en cuanto a los resultados observados. Por ello, consideramos necesario realizar un estudio que analizara mediante métodos más exactos la relación de la edad del hombre con la calidad seminal por medio del estudio apoptótico de los espermatozoides maduros.

## **JUSTIFICACION**

La disminución y retardo en la función espermática relacionados con la edad es un campo de estudio poco explorado.

La fluctuación de las constantes de concentración, movilidad y morfología también se ven afectadas por diversas condiciones; que modularán cíclicamente la expresión de los parámetros mencionados. Por otra parte, en cuanto a la búsqueda de la relación de marcadores apoptóticos con la edad, pocos han sido los estudios que se han realizado, y existe controversia en cuanto a su comportamiento conforme avanza la edad; además, ninguno de ellos evalúa diferentes marcadores en el mismo estudio.

Por lo anterior, consideramos necesario realizar un estudio que analice mediante citometría de flujo dos marcadores apoptóticos al mismo tiempo, ya que esta técnica posee una mayor sensibilidad y especificidad al valorar apoptosis en las células.

De este modo se pretende evaluar las características funcionales del análisis seminal en sujetos de diferentes décadas de la vida y su relación con el grado de apoptosis expresado al momento de su determinación.

## **7. METODO DE MUESTREO Y ANALISIS DE LA MUESTRA.**

---

### ***Tipo de investigación***

Observacional.

### ***Tipo de diseño y característica***

Estudio transversal, analítico.

### ***Pregunta de investigación***

¿El semen de pacientes sanos con fertilidad comprobada muestra mayor cantidad de marcadores apoptóticos conforme la edad avanza?

### ***Lugar y duración***

Instituto Nacional de Perinatología, inicio en marzo del 2009 a marzo del 2010.

### ***Universo, unidades de observación, métodos de muestreo y tamaño de la muestra***

#### ***Universo***

Varones sanos con fertilidad comprobada que acudan como voluntarios al servicio de Reproducción Asistida del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

#### ***Unidades de Observación:***

Marcadores Apoptóticos de varones sanos con fertilidad comprobada.

### ***Tamaño de la Muestra***

Se incluirán 5 sujetos, voluntarios, por cada década de la vida, a partir de los 20 años de edad y se pretende recabar un total de 25 sujetos debido a que es un estudio piloto y a que no existe ningún estudio previo que analice mediante la misma técnica los distintos marcadores apoptóticos correlacionándolos con la edad de los pacientes.

### ***Criterios de inclusión y exclusión***

Inclusión:

- Pacientes mayores de 20 años y menores de 70 años de edad, que acepten participar en el estudio.
- Fertilidad probada.
- Espermocultivo negativo.
- Muestra seminal con cuenta leucocitaria menor a  $1 \times 10^6$  /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.

### ***Variables del estudio***

Independientes:

- Décadas de la vida.

Dependientes:

- Marcadores apoptóticos:

Tempranos (Identificación de la fosfatidilserina (FS) en la capa externa de la membrana celular, mediante la adición de anexina V).

Tardíos (Fragmentación de ADN, por medio del método TUNEL).

- Parámetros seminales: Movilidad, concentración y morfología espermática.

La metodología para la determinación de cada una de las variables anteriores se describe en el ANEXO 1.

## 8. ANALISIS ESTADÍSTICO

---

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS versión 17; para la descripción de las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central, la comparación de los grupos se realizó mediante prueba de la *T de Student* y *Kruskar Wallis* según fuera apropiado. De igual forma se utilizó prueba de *ANOVA*. Las correlaciones se determinaron mediante *rho de Spearman* y regresiones logísticas simples.

## 9. ASPECTOS ETICOS

---

Los pacientes que formaron parte del protocolo de investigación firmaron una carta de consentimiento informado. Los participantes recibieron asesoría en cualquier momento y se les planteó la oportunidad de renunciar al protocolo en el momento que ellos desearan. La participación de los voluntarios fue confidencial en todo momento. (ANEXO 2)

## 10. RECOLECCIÓN DE DATOS

---

Los parámetros seminales fueron recolectados de pruebas postcapacitación espermática y los datos sobre apoptosis se obtuvieron mediante citometría de flujo reportándose los porcentajes de células positivas y negativas para Anexina V, TUNEL y Yoduro de Propidio.

### ***Prueba piloto***

Con muestras seminales de pacientes que acudieron al servicio de Reproducción Asistida se realizaron pruebas para estandarizar el citómetro de flujo y posteriormente analizar los resultados obtenidos.



## 11.RESULTADOS.

---

- **Parámetros seminales**

En la tabla 1 se presentan los parámetros seminales básicos. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos para la concentración espermática ( $p < 0.02$ ), con un declive obvio conforme se incrementa la edad, en el resto de los parámetros no se alcanzó significancia estadística sin embargo si se observa una tendencia a su decremento conforme avanza la edad. Resultados que se soportan con correlaciones positivas para la concentración, movilidad y morfología con los siguientes resultados: ( $r = -.52, P < 0.01$ ), ( $r = -.67, P < 0.01$ ) y ( $r = -.47, P < 0.05$ ) respectivamente.

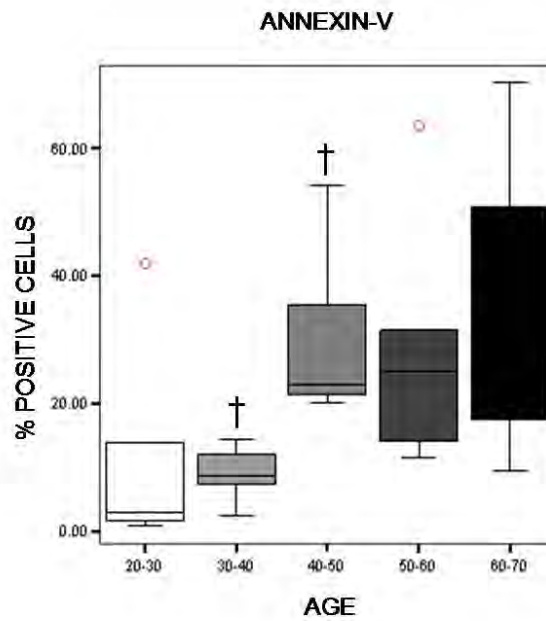
Tabla 1. Parámetros seminales

	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>	<i>Grupo 4</i>	<i>Grupo 5</i>	<i>P</i>
Edad (Años)	20-30	31-40	41-50	51-60	61-70	
Movilidad A (%)	14.8 ±11.6	45.4±46	10.8±7.2	4.5±3.3	1.7±2.0	.020
Concentración (x10 <sup>6</sup> /ml)	101±48	41.4±22	85.8±37	41.3±30	18.7±18.9	.027
Morfología (%)	8.3±3.6	9.2±3.1	9±1.2	6.3±2.5	4.5±.57	.076

- **Biomarcadores de apoptosis**

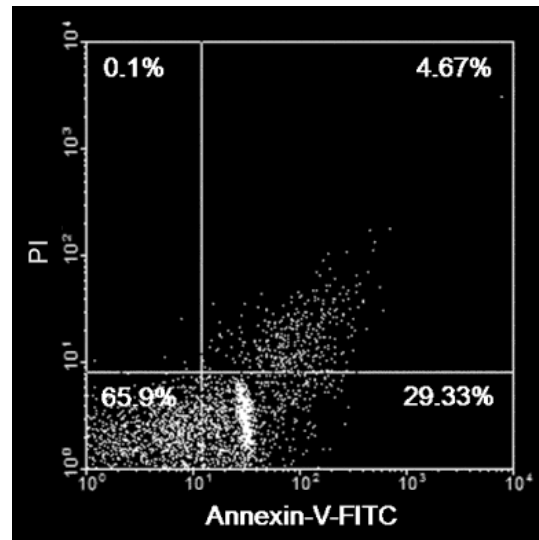
En la tabla 2 se presentan los resultados de Anexina estratificados por grupos, encontrándose un mayor porcentaje de células positivas para Anexina V en los espermatozoides de sujetos de edad avanzada (ANOVA 0.01). La comparación de células (Anexin-V+/PI+) entre hombres > y < de 40 años de edad resultó con una media de  $9.8 \pm 11.7\%$  y  $30.7 \pm 18\%$ , respectivamente ( $p$  0.003).

Figura 1. Comportamiento de Anexina V por grupos de edad.



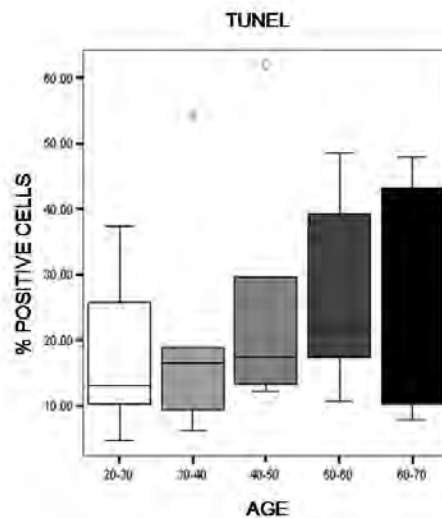
**Figura 2.**

Caso muestra de determinación de Anexina V mediante citometría de flujo, 29.3% de celularidad positiva para Anexina V, 65.9% células viables, 4.6% células necróticas.



De igual forma en la tabla 2 se presentan los resultados para la determinación de apoptosis tardía por el método de TUNEL, encontrándose una tendencia a la fragmentación del ADN conforme se incrementa la edad sin embargo no se alcanzó significancia (ANOVA >0.05).

Figura 3. Comportamiento de TUNEL por grupo de edad.



**Figura 4.**

Caso muestra de determinación de TUNEL mediante citometría de flujo, 8.4% de celularidad positiva para TUNEL, 88.4% células viables, 3.1 y 0.1% células no teñidas.

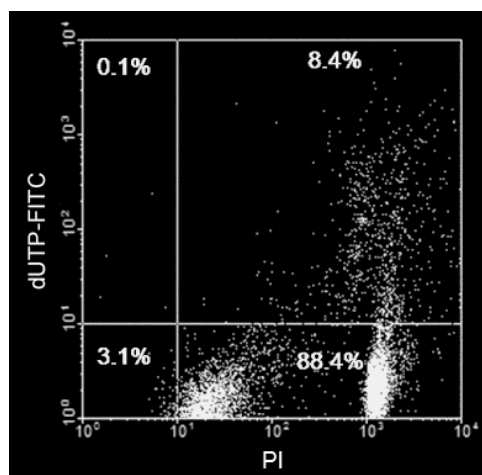


Tabla 2. Comportamiento de marcadores de apoptosis por grupo de edad.

	Grupo1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Edad (Años)	20-30	31-40	41-50	51-60	61-70
TUNEL (%)	17.3±12	21±19.2	26.9±20.7	26.5±14.3	26.7±19.5
ANEXINA V <sup>a</sup> (%)	10.6±16	8.9±4.6	30.3±14.4	28.4±18.7	34±25.7

<sup>a</sup> P <0.05

## 12. DISCUSION

---

Tradicionalmente la evaluación del espermatozoide se había limitado a su observación ya fuera en muestras “crudas” o sometidas a un proceso de capacitación, las conclusiones de esta evaluación indican un deterioro de los parámetros seminales (movilidad, concentración, morfología) conforme se incrementa la edad del hombre, observaciones que resultan acordes a las encontradas en este estudio.

Los estudios realizados para valorar la funcionalidad en los procesos relacionados con el componente espermático a través de la expresión de marcadores apoptóticos han sido evaluados en la última década. Esto nos ha mostrado que procesos tanto tempranos como tardíos influyen no solo en la capacidad de fertilización, proceso preimplantatorio y desarrollo embrionario, sino también en la transmisión de enfermedades génicas relacionadas a alteraciones en el cromosoma Y.

Actualmente sabemos que la evaluación en el grado de fragmentación de ADN en el espermatozoide tiene impacto directo en los procesos de fertilización lo cual ha sido demostrado clínicamente en pacientes con inseminación itrauterina, fertilización in vitro e inyección intracitoplasmática.

Diversos modelos han sido descritos para el reconocimiento en la activación de la cascada apoptótica en el espermatozoide entre los cuales se incluyen a la traslocación de fosfatidil serina, activación de caspasas (fas ligando de fas, caspasa 3 activada), formación de oligonucleosomas y que han sido auxiliares diagnósticos en la evaluación de la función del espermatozoide.

Sin embargo la mayoría de los hallazgos antes mencionados han sido encontrados y/o evaluados en población masculina infértil y en edad reproductiva, por lo que el objetivo de este estudio fue el

analizar el comportamiento de dos marcadores de apoptosis en sujetos fértiles y su comportamiento conforme se incrementa la edad del sujeto.

De este modo en la literatura revisada no se encontró estudio previo que realizara estas comparaciones, de forma que con nuestros resultados se demuestra que el incremento en la edad del hombre se relaciona con una mayor expresión de marcadores de apoptosis temprana, y parece ser que el punto de corte para dicho incremento son los 40 años de edad; respecto a los marcadores tardíos a pesar de no haber diferencias significativas si se observa una tendencia hacia su incremento conforme la edad avanza.

La importancia de ello radica en el conocimiento actual de la disfunción del espermatozoide como la causa más frecuente de infertilidad, sin embargo, el diagnóstico patogénico y fisiopatológico son pobres, y excluyendo las TRA, no hay en general tratamiento adecuado. La información genética provista por el espermatozoide está regulada a distintos niveles epigenéticos incluyendo modificaciones del ADN mediante impronta, códigos de histonas y zonas asociadas, y probablemente organización espacial cromosómica, pero el gameto masculino no debe ser más visto como un simple portador de información genética. Por estos motivos, es fundamental que la investigación clínica esté dirigida al análisis de las causas etiológicas resultantes en lesiones y disfunciones del gameto masculino a nivel bioquímico, molecular y genético, y al esclarecimiento de sus contribuciones más allá de la fertilización, incluyendo posible repercusiones en los procesos de implantación, placentación y la salud de la prole.

Por último consideramos que para darle una mayor fuerza a estos resultados, resultaría prudente incrementar el tamaño de la muestra y sería ideal poder realizar un análisis del comportamiento de marcadores apoptóticos seminales, determinados de forma longitudinal.

### **13. CONCLUSIONES**

---

El incremento en la edad del hombre se relaciona con un deterioro en parámetros seminales tales como la concentración y movilidad espermática.

Los biomarcadores de apoptosis se ven afectados por la edad del sujeto, resultando significancia estadística para los procesos de transformación biomolecular de membrana determinados mediante la determinación de fosfatidilserina, en el caso de los procesos tardíos se concluye que existe una tendencia para el incremento de los mismos a mayor edad del sujeto sin embargo es posible, con la finalidad de obtener diferencias estadísticamente significativas, sea necesario ampliar el tamaño de la muestra.

El punto de corte para el incremento de marcadores de apoptosis temprana son los 40 años de edad.

## 14. ANEXOS.

---

### **ANEXO 1. Método de muestreo**

- Evaluación de diferentes parámetros seminales (movilidad, morfología y concentración) y marcadores apoptóticos tempranos y tardíos en muestras seminales de 25 pacientes sanos con fertilidad comprobada en diferentes décadas de la vida. Las muestras seminales obtenidas de los pacientes voluntarios serán recolectadas con un periodo de abstinencia de 3 a 5 días. Cada muestra será analizada de forma independiente para determinar concentración, movilidad y morfología. Posteriormente, se analizará cada muestra seminal con Anexina V (marcador temprano de apoptosis) y con el método de TUNEL (marcador tardío de apoptosis) mediante el uso de citometría de flujo.
- Finalmente, se reportarán los porcentajes de células positivas como negativas de los marcadores Anexina V, TUNEL, y yoduro de propidio mediante citometría de flujo. Los valores obtenidos (porcentajes) de los marcadores apoptóticos se correlacionarán con la edad de los pacientes.
- Evaluación de movilidad, concentración y morfología espermática.

Los pacientes coleccionarán una muestra de semen en contenedores estériles después de 3 a 5 días de abstinencia sexual. La concentración espermática, la motilidad y morfología serán evaluadas en la muestra original. Después de licuefacción (30-45 minutos), 5 µl de cada muestra será colocada en una cámara de Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) y se leerá bajo el microscopio de luz para motilidad y concentración espermática. Por otra parte, la morfología se evaluará de acuerdo a los criterios estrictos de Kruger. Para ello, cada muestra (10µl) se extenderá en un portaobjetos y se dejará secar por 20 minutos antes de teñirse con la tinción Diff-Quick (Baxter Dade Diagnostics, Dubingen, Switzerland), se leerá un promedio de 100 espermatozoides por extendido bajo microscopía de luz en objetivo de inmersión 100X. Finalmente, las muestras se mantendrán a 37°C, 5%CO<sup>2</sup> en medio HFT y serán analizadas independientemente para Anexina V, anticuerpos anti-caspasa 3 y yoduro de propidio además de método de TUNEL en la siguiente media hora.

- Evaluación de externalización de fosfatidil-serina 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 a células apoptóticas típicamente muestra una tinción verde fluorescente. El yoduro de propidio (tinción roja) será agregado 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 lavarán  $10^6$  células de cada muestra (móvil y no móvil) en PBS (buffer de solución salina fosfatada) y se centrifugará la muestra a  $200 \times g$  por 5 minutos. Las muestras serán resuspendidas en  $100 \mu\text{l}$  de una solución que contendrá Anexina-V marcada con fluoresceína además de IP (la solución se prepara prediluyendo  $20 \mu\text{l}$  de Anexina-V-fluoresceína en 1 ml del buffer de incubación adicionando  $20 \mu\text{l}$  de la solución de IP) y se incubarán por 10-15 minutos a una temperatura de  $15-25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Finalmente, las muestras serán analizadas por citometría de flujo previa adición de 0.5 ml de un buffer de incubación por  $10^6$  células. En el citómetro de flujo, las muestras se leerán a 488nm con un filtro de 515nm para la detección de Anexina-V-fluoresceína y un filtro de más de 600nm para la detección de PI (yoduro de propidio). Se requiere compensación electrónica del instrumento para evitar traslapaciones de los dos espectros emitidos.

- Evaluación de apoptosis mediante el método de TUNEL:

Uno de los eventos tardíos de la cascada apoptótica es la activación de endonucleasas endógenas que genera fragmentaciones en el ADN. El método llamado TUNEL es capaz de detectar éste tipo de células mediante la adición de una enzima terminal de desoxinucleotidil transferasa (TdT) para la incorporación de desoxinucleótidos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Para realizar el método de TUNEL el cual requiere de dos etapas (fijación y tinción) utilizaremos el kit APO-DIRECT. El kit incluye 5 ml de suspensiones celulares control tanto positivas como negativas, de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por ml en etanol 70% (v/v). Las células control se derivan de una línea celular de linfoma humano y han sido fijadas como se fijarán las células muestra que se explica a continuación.

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 colocar la suspensión celular en hielo por 30-60 min. Después, se centrifugarán las células durante 5 min a  $300 \times g$  y se desechará el sobrenadante. A continuación, se lavarán las células en 5 ml de PBS y se centrifugará para obtener el paquete celular (este paso se realizará en dos ocasiones). Posteriormente se resuspenderá el paquete celular en el PBS residual mediante agitación moderada en vortex. Se ajustará 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 almacenarán las células en etanol al 70% (v/v) a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Tinción y Análisis: Se resuspenderán las células control positivas y negativas (6552LZ, 6553LZ) en sus respectivos viales. Se tomará una alícuota de 1 ml de la suspensión de las células control (aprox.  $1 \times 10^6$  células/1 ml) y se colocarán en tubos de 12 x 75 mm para citometría de flujo. Se centrifugarán a  $300 \times g$  por 5 min y se removerá el etanol al 70% (V/V) por aspiración sin alterar el paquete celular. Se resuspenderá cada tubo de células control con 1 ml del buffer de lavado (6548AZ), se centrifugará a  $300 \times g$  por 5 min y se removerá el sobrenadante. Se repetirá el tratamiento de lavado y después, se resuspenderá cada paquete celular control con 50  $\mu\text{l}$  de la solución de tinción (contiene el buffer de reacción para la enzima TdT, la enzima TdT, fluoresceína conjugada con dUTP [6549AZ, 6554EZ, 6555EZ] y agua destilada).

Posteriormente, se incubarán las células en la solución de tinción por 60 min a  $37^\circ\text{C}$  y al finalizar el periodo de incubación se añadirá 1 ml. del buffer de enjuague (0.05% Azida de Sodio 6550AZ) a cada tubo, se centrifugará a  $300 \times g$  por 5 min y se removerá el sobrenadante por aspiración (en dos ocasiones). A continuación, se resuspenderá el paquete celular en 0.5 ml del buffer de tinción con yoduro de propidio/RNasa (6551AZ) y se incubarán las células en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se analizarán las células en la solución de yoduro de propidio/RNasa por citometría de flujo después de 3 horas de concluir con la tinción.

## **ANEXO 2. Consentimiento informado**

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

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: “Correlación de indicadores apoptóticos de inicio temprano y tardío en espermatozoides de sujetos en diferentes décadas de la vida”.

Responsable: Dr. Gerardo Barroso Villa, Investigador: Instituto Nacional de Perinatología, Teléfono 55209900.

Invitación de Participación:

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

PROPÓSITO: El propósito de este estudio es analizar la relación de la edad con la calidad de los espermatozoides contenidos en el eyaculado. Durante esta investigación requeriremos la donación de una muestra seminal. Al mismo tiempo que se recolecte la muestra seminal se le tomará una muestra de sangre periférica que será obtenida de su brazo.

METODOLOGÍA: Ambos estudios son solicitados regularmente por los especialistas de Biología de la Reproducción y se realizan 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 INPerIER y no representa riesgo alguno para el hombre ni su capacidad de fertilidad.

La toma de muestra sanguínea periférica es de uso rutinario en cualquier institución de salud y los riesgos que puede tener son mínimos y en un porcentaje muy bajo. Los riesgos son infección en la zona de punción, dolor y un hematoma (moretón) en la zona de punción.

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.

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 en cualquier momento, sin que esto afecte su atención médica presente o futura en esta institución.

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 hablar con el 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: 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

## 15. REFERENCIAS

---

1. Kerr J, Wyllie A, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239–57.
2. Wyllie A. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284:555-556.
3. Print C, Loveland K. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000; 22:423-430.
4. Kierzenbaum A. Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive. *Mol Reprod Dev* 2001; 58:1-3.
5. Lin W, Lamb D, Wheeler T, Lipshult L, Kim E. In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997; 68: 1065-1069.
6. Sinha Hikim A, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X, Swerdloff R. Spontaneous germ cell apoptosis in human: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 83, 152-156.
7. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28:587–96.
8. 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. *Hum Reprod* 2002; 17, 5: 1266-1273.
9. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15: 1338-1344.
10. Oosterhuis G, Mulder A, Kalsbeek-Batenburg E, Lamblak C, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000; 74: 245-250.
11. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281:1312–6.

12. Wolf B, Green D. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:20049–52.
13. Earnshaw W, Martins L, Kaufmann S. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:383–424
14. Villa P, Kaufmann S, Earnshaw W. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:388–393.
15. Nunez G, Benedict M, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17:3237–3245.
16. Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, Tsuruo T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 1997; 14:1007–1012.
17. Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 138:1379–1394.
18. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, et al. Yama/ CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995; 81:801–809.
19. Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, et al. Cleavage of lamin A by Mch2\_ but not CPP32: multiple interleukin 1\_-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:8395–8400.
20. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1999; 391:43–50.
21. Liu X, Li P, Widlak P. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8461–8466.
22. Halenbeck R, MacDonald H, Roulston A, Chen TT, Conroy L, Williams LT. CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol* 1998; 8:537–540.
23. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.

24. Potts R, Newbury C, Smith G. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999; 423:103–11.
25. Sailer B, Sarkar L, Bjordahl J, et al. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997; 18:294–301.
26. Banks S, King S, Irvine D, et al. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005; 129:505–14.
27. Morris I. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002; 25:255-61.
28. Sailer B, Jost L, Erickson K, et al. Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Environ Mol Mutagen* 1995; 25:23–30.
29. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, et al. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 2002; 23:717–23.
30. Duru N, Mahmood M, Schuffner A, Oehninger S. Criopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine, *Fertil Steril* 2001; 75: 263-268.
31. Critser J, Arneson B, Asker D, Huse-Benda A, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Post-thaw chronology on motility and on zone-free hamster ova penetration. *Fertil Steril* 1987; 47: 980–4.
32. O'Brien J, Zini A. Sperm and DNA integrity and male infertility. *Urology* 2005;65:16-22.
33. Singh N, Muller C, Berger R. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80:1420-30.
34. Kidd S, Eskenazi B, Wyrobek A. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001; 75: 237-248.
35. Chia S, Lim S, Tay S, Lim S. Factors associated with male infertility: a case-control study of 218 infertile and 240 fertile men. *BJOG* 2000;107:55-61.
36. Hassan M, Killick S. Effect of male age on fertility:evidence for the decline in male fertility with increasing age. *Fertil Steril* 2003;79:1520-27.
37. Chen Z, Toth T, Godfrey L, Mercedat N, Schiff I, Hauser R. Seasonal variation and age-related changes in human semen parameters. *J Androl* 2003; 24:226-231.

38. Chen Z, Hauser R, Trbovich A, Shifren J, Dorer D. The relationship between, human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J Androl* 2006;27:112-120.
39. Ricci G, Pericarari S, Boscolo R, Montico M, Guashino S. Semen preparation methods and sperm apoptosis swim up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil Steril* 2008. In Press
40. Hoogendijk C, Kruger T, Bouic P, Henkel R. A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertil Steril* 2008. In Press.
41. Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009; 91:1077-84.
42. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Menezo Y, Clement P, Hamidi P, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 2008. In Press.
43. Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendaño C, et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril* 2009; 92:835-48.