

Trabajos Libres

Niveles de correlación entre la externalización de fosfatidilserina y apoptosis espermática en pacientes con infertilidad masculina

Heydy Uriondo,¹ Cristian Álvarez Sedó,^{1,2} María Virginia Gil,¹ Paula Frazer,¹ Janny Serna,¹ Florencia Nodar¹

¹ Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGYR), Buenos Aires, Argentina.

² Laboratorio de Patología y Fisiología Testicular, Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2011;26:111-116

Resumen

El presente trabajo pretende evaluar los niveles de externalización de fosfatidilserina-PS (apoptosis temprana) y los eventos de apoptosis tardíos (caspasa-3 activa y fragmentación del ADN) en pacientes con infertilidad masculina. Se evaluaron 72 pacientes para cuantificar los niveles de PS, caspasa-3 activa (C3A) y fragmentación del ADN (TUNEL). Los pacientes fueron agrupados según el criterio de morfología de Kruger en: $K \leq 4\%$ (I), $5\% \leq K \leq 13\%$ (II) y $K \geq 14\%$ (III). Así mismo, se evaluó el impacto de la edad en la población considerando pacientes ≤ 34 años (A), entre 35-45 años (B) y aquellos ≥ 46 años (C). La fracción móvil de espermatozoides fue obtenida luego de un gradiente de dos capas. Una fracción del pellet fue incubada con una alícuota de Anexina V (AnV) para evaluar la externalización de PS. La fracción restante fue fijada y procesada para la evaluación de C3A por inmunocitoquímica y TUNEL. En la población estudiada los niveles de AnV, C3A y TUNEL fueron 19.2%, 10.2% y 17.7%, respectivamente. En los grupos I, II y III los valores promedio de AnV fueron 24.8%, 17% y 13.3% respectivamente ($p < 0.05$). Los valores de AnV por grupo etario fueron 15.4% (A), 19% (B) y 29.3% (C) ($p < 0.05$). Los valores de TUNEL fueron significativamente superiores tanto en el grupo A (22.2%), así como en el grupo III (20.3%) ($p < 0.05$). Existe

correlación positiva entre la externalización de PS (AnV) y los marcadores de apoptosis tardía. En la población estudiada los niveles de externalización de PS y TUNEL son significativamente superiores en los casos con teratozoospermia severa ($K \leq 4\%$) y edad > 45 años.

Palabras claves. Espermatozoide, apoptosis, morfología, edad.

Correlation between phosphatidylserine externalization and sperm apoptosis in infertile men

Summary

The aim of this paper was to correlate and compare the levels of phosphatidylserine externalization-PS (early apoptosis), cleaved caspase-3 (C3A) and DNA fragmentation (TUNEL) (late apoptotic events) in seventy two patients with male infertility. To evaluate the impact of sperm morphology and age on these markers, patients were grouped according to their Kruger morphology index: $K \leq 4\%$ (I), $5\% \leq K \leq 13\%$ (II) and $K \geq 14\%$ (III), and age: ≤ 34 years (A), between 35 - 45 years (B) and ≥ 46 years (C). Sperm motile fraction was obtained after two-layer gradient. Alive spermatozoa were incubated with Annexin V (AnV) to assess the phosphatidylserine externalization. The remaining pellet was fixed and processed for immunocytochemistry (C3A) and TUNEL evaluation. Considering the overall population, the levels of AnV, C3A and TUNEL were

Correspondencia: Heydy Uriondo
E-mail: huriondo@fertimed.com.ar

19.2%, 10.2% and 17.7% respectively. In groups I, II and III the average AnV values were 24.8%, 17% and 13.3%, respectively ($p < 0.05$). Concerning to the age of the patients, AnV levels were 15.4% (A), 19% (B) and 29.3% (C) ($p < 0.05$). TUNEL levels were significantly higher in group A (22.2%) and group III (20.3%) ($p < 0.05$). There is positive correlation between PS (AnV) and late apoptosis markers. The levels of PS and TUNEL were significantly higher in cases with severe teratozoospermia ($K \leq 4\%$) and age ≥ 46 years.

Key words. Spermatozoa, apoptosis, morphology, age.

Introducción

El análisis de la fragmentación del ADN aportó nuevas expectativas en la búsqueda de explicación a las fallas repetidas de FIV-ICSI. Se ha descrito la importancia de la estabilidad del núcleo espermático relacionado al éxito reproductivo en humanos. Así, el incremento significativo de los niveles de fragmentación del ADN estaría asociado a bajas tasas de fertilización, implantación embrionaria e incremento de abortos.¹⁻⁷

Tantos factores físicos como metabólicos pueden inducir al daño del ADN espermático. Éste puede ocurrir en la espermatogénesis o durante el tránsito por el epidídimo.⁸⁻¹¹ De igual manera, se han identificado factores de riesgo asociados al incremento de la fragmentación del ADN, como: varicocele, criptorquidia, edad avanzada, teratozoospermia severa, episodios de fiebre alta, radio y quimio terapia.¹²⁻²⁰ El daño en el ADN puede ser de simple y/o de doble cadena, y éste ha podido ser evaluado por diversos métodos, destacando entre ellos la técnica de TUNEL (deoxynucleotidyl-transferase-mediated-dUTP-nick-end-labeling).^{7, 21-23}

Se ha reportado que la fragmentación del ADN puede estar asociada a eventos de apoptosis espermática.^{16,24-28} Al respecto, se han detectado marcadores de apoptosis en espermatozoides humanos, como: externalización de fosfatidilserina, caspasa-3 activa, fragmentación del ADN, etc.²⁹⁻³⁴

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los niveles de expresión y correlación de los marcadores de apoptosis, externalización de fosfatidilserina-PS (apoptosis temprana) y los even-

tos de apoptosis tardíos (caspasa-3 activa y fragmentación del ADN) en pacientes con infertilidad masculina.

Materiales y métodos

Población

Se evaluaron 72 varones con esterilidad primaria, con edades comprendidas entre 25 a 62 años. Todos los varones considerados para este estudio realizan tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad. En la Tabla I se presentan el número de pacientes agrupados según su edad y el porcentaje de espermatozoides normales (criterio estricto de Kruger).

Tabla 1. Número de pacientes (N=72) agrupados según su edad y morfología normal (según criterio de Kruger).

N total = 72	
Agrupados por edad	Número de pacientes (%)
≤ 34 años (A)	25 (34.7%)
entre 35-45 años (B)	36 (50.0%)
≥ 46 años (C)	11 (15.3%)
Agrupados por morfología normal (Kruger)	
$K \leq 4\%$ (I)	27 (34.5%)
$5\% \leq K \leq 13\%$ (II)	35 (48.6%)
$K \geq 14\%$ (III)	10 (16.9%)

Reactivos y anticuerpos

Todos los reactivos fueron obtenidos de *Sigma Chemical Co* (St Louis, EE.UU.). Por otro lado, el anticuerpo primario empleado fue: caspasa-3 activa, un anticuerpo monoclonal específico para la proteína caspasa-3 activa (anticuerpo monoclonal anti-conejo, dil: 1:100, *Cell Signaling Technology Inc*, Massachusetts, EE.UU.). El anticuerpo secundario empleado fue: 594 Anti-conejo (*Molecular Probes - Life Technologies*, Oregon, EE.UU.).

Se utilizó el kit (*Annexin V-FITC Apoptosis Kit - Abcam plc*, Oregon, EE.UU.) para la detección de externalización de fosfatidilserina, y el *In situ cell death detection kit, fluorescein* (*Roche Applied Science*, Mannheim, Alemania) para la detección de fragmentación del ADN (TUNEL).

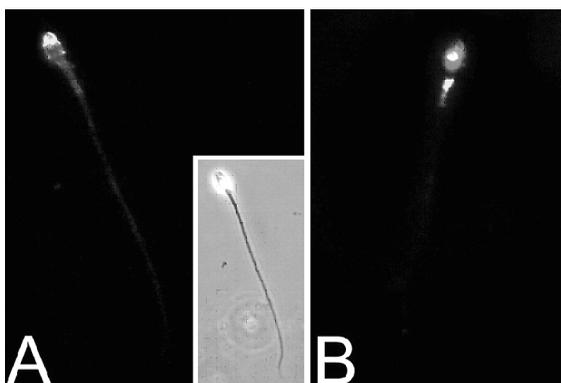
Preparación de la muestra

Las muestras fueron evaluadas y sometidas a separación espermática por gradiente de dos capas (*ISOLATE-Irvine Scientific*) según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999). El *pellet* obtenido fue lavado con *buffer* fosfato pH 7.4.

Evaluación de externalización de fosfatidilserina (EPS)

En una alícuota del *pellet* obtenido se evaluó la EPS mediante el *Annexin V-FITC Apoptosis Kit*. Brevemente, se lavó la muestra con PBS y el *pellet* se resuspendió en 500 uL del *buffer* de pegado, se agregó 5 uL de *Annexin V-FITC* y 5 uL de Ioduro de propidio (IP) y se incubó por 5 minutos. La detección fue realizada mediante microscopía de fluorescencia. Se consideró en el estudio a los espermatozoides vivos y apoptóticos (IP-/Anexina V+) más no las células muertas (IP+/Anexina V+) (Figura 1). Se contaron 500 espermatozoides.

Figura 1. Patrones observados: A) IP-/Anexina V+ y B) IP+/Anexina V+.



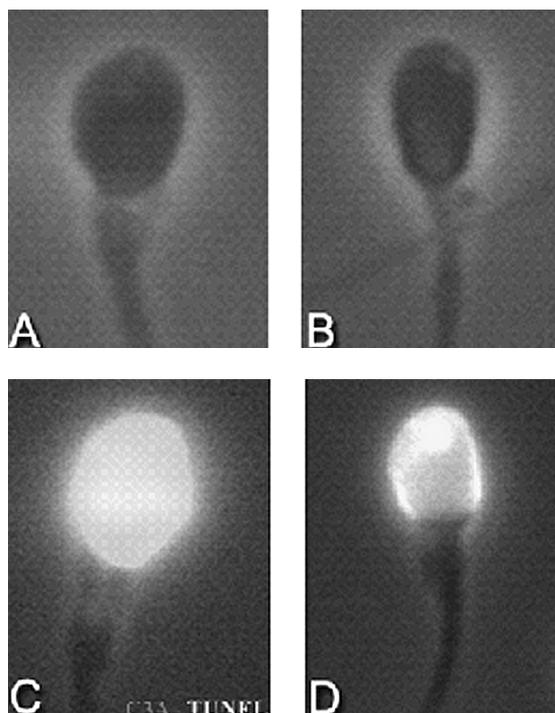
Evaluación de la fragmentación del ADN (TUNEL) y caspasa-3 activa (C3A)

La restante muestra se fijó en PBS-Formaldehído al 2%. Seguidamente fueron lavadas y permeabilizadas con metanol frío. Se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA 0,5% en PBS; se agregó el anticuerpo primario anti-C3A. Luego se agregó el anticuerpo secundario Alexa-Fluor-568 (1:200). Posteriormente, se incubó con la solución de TUNEL para finalmente lavar y montar

con Vectashield H-1.000 (*Vector Laboratories*). Se contaron 500 espermatozoides. Los patrones observados son representados en la Figura 2.

Figura 2. Patrones observados:

A) Normal, B) C3A+/TUNEL-, C) C3A+/TUNEL+, y D) C3A-/TUNEL+.



Análisis estadístico

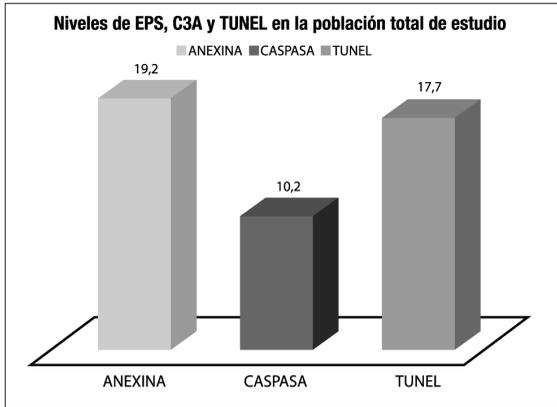
El análisis estadístico se realizó con ANOVA y correlación de Pearson. Se tomó en cuenta un $p \leq 0.05$ para establecer diferencias significativas. Se empleó el programa estadístico *Statistix 9.0* (2008v).

Resultados

En la población estudiada los niveles de AnV, C3A y TUNEL fueron 19.2%, 10.2% y 17.7% respectivamente (Figura 3). La correlación entre AnV vs C3A y TUNEL fue de 0.47 y 0.60 ($p < 0.05$).

Cuando los pacientes fueron agrupados según su edad: ≤ 34 años (A), entre 35-45 años (B) y ≥ 46 años (C), los valores obtenidos para AnV, C3A y TUNEL fueron: 14.9 ± 8.8 (A), 18.9 ± 8.8 (B) y 29.5 ± 14.9 (C); 9.3 ± 6.1 (A),

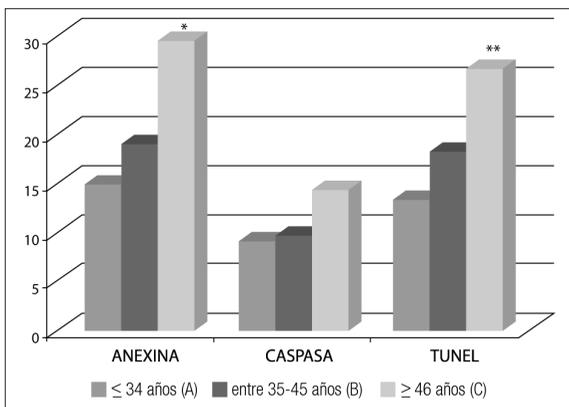
Figura 3. Niveles de AnV, C3A y TUNEL en la población estudiada.



9.6 ± 5.3 (B) y 14.3 ± 5.8 (C); 13.4 ± 7.1 (A), 18.0 ± 10.2 (B) y 26.5 ± 15.1 (C), respectivamente (Figura 4). Para el grupo A, la correlación entre AnV vs C3A fue de 0.64 y TUNEL de 0.74. De igual manera, para el grupo B, la correlación entre AnV vs C3A fue de 0.67 y TUNEL de 0.72. Finalmente, para el grupo C, la correlación entre AnV vs C3A fue de 0.76 y TUNEL de 0.85, todas las correlaciones presentaron un p<0.05.

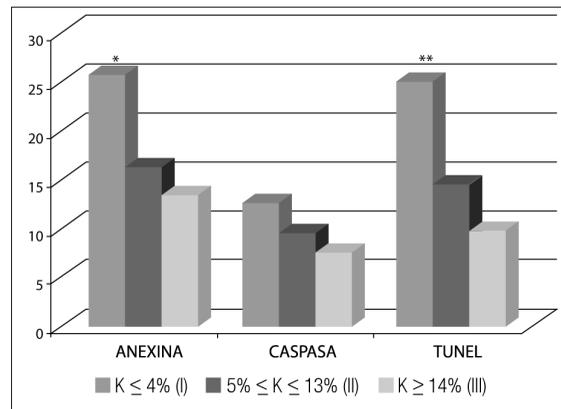
Cuando los pacientes fueron agrupados según la morfología normal por el criterio estricto de Kruger: K ≤ 4% (I), 5% ≤ K ≤ 13% (II) y K ≥ 14% (III), los valores obtenidos para AnV, C3A y TUNEL fueron: 25.5 ± 11.3 (I), 15.9 ± 9.0 (II) y 13.3 ± 7.6 (III); 12.6 ± 5.5 (I), 9.2 ±

Figura 4. Niveles de AnV, C3A y TUNEL en pacientes agrupados según su edad (*p<0.05 anexina: A vs B y C, y **p<0.05 TUNEL: A vs B y C).



4.9 (II) y 7.4 ± 5.4 (III); 24.9 ± 11.9 (I), 14.4 ± 7.4 (II) y 9.8 ± 5.5 (III), respectivamente (Figura 5). Para el grupo I, la correlación entre AnV vs C3A fue de 0.67 y TUNEL de 0.75. De igual manera, para el grupo II, la correlación entre AnV vs C3A fue de 0.63 y TUNEL de 0.73. Finalmente, para el grupo III, la correlación entre AnV vs C3A fue de 0.62 y TUNEL de 0.69. Todas las correlaciones presentaron un p<0.05.

Figura 5. Niveles de AnV, C3A y TUNEL en pacientes agrupados según la morfología espermática por criterio estricto de Kruger (*p<0.05 anexina: I vs II y III, y **p<0.05 TUNEL: I vs II y III).



Discusión

Como se comentó al inicio, varios estudios han demostrado que los hombres con edad avanzada parecen producir más espermatozoides con daño en el ADN, por ejemplo, fragmentación del ADN, apoptosis, trastornos en la compactación de la cromatina, mutaciones genéticas y/o aneuploidías.

Un aumento en la fragmentación del ADN (demostrado por análisis de TUNEL) ha sido también vinculado a los pacientes astenoteratozoospermicos (OAT) y con edad avanzada.^{13,27,35-37} Sin embargo, ninguno de estos estudios encontró alguna evidencia de un umbral de edad.

Nuestro grupo de trabajo ha venido realizando estudios de investigación a nivel de la apoptosis espermática y la fragmentación del ADN en un gran número de pacientes que realizan tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad (TRA). En reportes publicados anterior-

mente, se destaca que pacientes con trastornos en la morfología espermática y con edad avanzada presentaban mayores niveles de fragmentación del ADN.³⁸⁻³⁹

En el presente trabajo se evidenció de manera prospectiva que la edad (≥ 46 años) y los niveles de alteración severa en la morfología espermática (Kruger $\leq 4\%$) pueden estar asociados a mayores niveles de fragmentación del ADN, y al mismo tiempo presentar una correlación positiva con los niveles de marcadores de apoptosis (externalización de la fosfatidilserina y la caspasa-3 activa).

Creemos que la implementación y ejecución de estas técnicas en relación a este tema podría significar el surgimiento de una herramienta de diagnóstico muy eficaz para la evaluación de las patologías subyacentes. Sin embargo, somos conscientes de que se necesitan estudios a gran escala en diferentes situaciones clínicas para determinar los efectos del daño en el ADN espermático en los resultados de los TRA.

Referencias

1. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, y col. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003;49:49-55.
2. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, y col. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2004;82:378-383.
3. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004;81:1289-1295.
4. Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005;322:333-341.
5. Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, y col. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril* 2008;89:1191-1199.
6. Aitken RJ, De Iulius GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2009;32:46-56.
7. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93(4):1027-1036.
8. Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, y col. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl* 2005;28:171-179.
9. Aitken RJ, Wingate JK, De Iulius GN, y col. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4154-4163.
10. Aitken RJ, De Iulius GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007;14:727-733.
11. Banks S, King SA, Irvine DS, y col. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005;129:505-514.
12. Evenson DP, Jost LK, Corzett M, y col. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 2000;21(5):739-746.
13. Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;30:5-36.
14. Delbes G, Hales BF, Robaire B. Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *J Androl* 2007;28(2):241-249.
15. Smith R, Kaune H, Parodi D, y col. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress. *Rev Med Chil* 2007;135(3):279-286.
16. Smit M, van Casteren NJ, Wildhagen ME, y col. Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum Reprod* 2010;25(8):1877-1883.
17. Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, y col. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online* 2007;15(5):514-519.
18. Wu GJ, Chang FW, Lee SS, y col. Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertil Steril* 2009;91(3):831-837.
19. Moskovtsev SI, Willis J, White J, y col. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 2009;74(4):789-793.
20. Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, y col. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia* 2009;41(6):383-386.
21. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, y col. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20(12):3446-3451.
22. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersbøll AK, y col. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 2006;21(6):1576-1582.
23. Avendaño C, Franchi A, Taylor S, y col. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009;91(4):1077-1084.
24. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, y col. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002;66(4):1061-1067.

25. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, y col. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003;7(4):428-432.
26. Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, y col. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003;7(4):469-476.
27. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003;80(6):1420-1430.
28. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, y col. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004;19(1):129-138.
29. Almeida C, Sousa M, Barros A. Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2009;19(6):770-777.
30. Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999;5(2):109-115.
31. Kotwicka M, Filipiak K, Jedrzejczak P, y col. Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *Reprod Biomed Online* 2008;16(5):657-663.
32. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, y col. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003;24(2):246-252.
33. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, y col. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004;81(1):802-809.
34. Shen HM, Dai J, Chia SE, y col. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002;17(5):1266-1273.
35. Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JBM. Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril* 2006;85:496-499.
36. Moskovtsev SI, Willis J, White J, y col. Sperm survival: relationship to age-related sperm DNA integrity in infertile men. *Arch Androl* 2007;53:29-32.
37. Plastira K, Msaouel P, Angelopoulou R, y col. The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:437-443.
38. Alvarez Sedó C, Uriondo Heydy, Alvarez G y col., Niveles de fragmentación del ADN espermático y marcadores de apoptosis en pacientes con teratozoospermia severa. *Reproducción* 2009;24:17.
39. Rawe VY, Alvarez Sedó C, Uriondo H, y col. Influencia de la patología espermática en reproducción asistida. *Reproducción* 2009;24(4):189-198.