

Impacto del envejecimiento masculino en la capacidad funcional del espermatozoide a través de la expresión de fosfatidil serina y oligonucleomas*

Alinne Colin-Valenzuela,* Nardhy Gómez-López,** Rosaura Ávila-Lombardo,**** Gerardo Barroso-Villa***

Nivel de evidencia: II-1

RESUMEN

Antecedentes: los procesos biomoleculares asociados con el envejecimiento y la muerte celular programada durante la espermatogénesis son bien conocidos, pero no su trascendencia biológica en el espermatozoide eyaculado, porque se ignora el comportamiento de estos marcadores apoptóticos en relación con la edad del hombre.

Objetivo: evaluar el efecto del envejecimiento en la capacidad funcional del espermatozoide y su relación con los procesos de muerte celular programada.

Material y método: estudio prospectivo, transversal y analítico efectuado con muestras seminales de 25 sujetos sanos de 20 a 70 años de edad, que se dividieron en dos grupos [(A: menores de 40 años) y (B: mayores de 40 años de edad)]. Se evaluaron los parámetros seminales OMS (1999) y los procesos de transformación biomolecular de membrana y la expresión por oligonucleosomas en la cascada terminal de apoptosis. Se cuantificaron por medio de citometría de flujo con láser de argón como fuente de lectura a 480 nm, discriminando los grados de celularidad negativa y positiva para cada uno de los indicadores.

Resultados: el porcentaje de células vivas con traslocación de fosfatidil serina en la membrana (anexina-V+/PI+) fue significativamente superior en los hombres mayores de 40 años ($p < 0.05$). Estos hallazgos se enriquecen con 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, sí se observó una tendencia clara de aumento conforme mayores eran los sujetos ($r = 0.51$).

Conclusiones: el incremento en la edad del hombre se asocia con aumento en la expresión de marcadores de apoptosis, lo que se demuestra por la mayor expresión de la traslocación de fosfatidil serina a nivel membranar. Así, este estudio confirma que la edad del sujeto se asocia con un declive en algunos de los parámetros seminales.

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

ABSTRACT

Background: biomolecular processes associated with aging and programmed cell death during spermatogenesis are well known, but not its biological significance in ejaculated sperm, because it ignores the behavior of these apoptotic markers in relation to the age of man.

Objective: To evaluate the effect of aging on the functional capacity of sperm and their relationship to programmed cell death processes.

Material and methods: Prospective, cross-sectional and analytical performed with semen samples from 25 healthy subjects 20 to 70 years old, were divided into two groups [(A: under 40 years) and (B: over 40 years age)]. Semen parameters were evaluated WHO (1999) and transformation processes biomolecular membrane and the expression of oligonucleosomes in the terminal cascade of apoptosis. Were measured by flow cytometry with an argon laser as a source of reading at 480 nm, the degree of cellularity discriminate negative and positive for each of the indicators.

Results: The percentage of live cells with phosphatidylserine translocation in the membrane (annexin-V / PI) was significantly higher in men older than 40 years ($p < 0.05$). These findings are enriched with a significant positive correlation ($r = 0.50$, $P < 0.008$) between early biomarker and age of the subjects. With regard to DNA fragmentation, although no statistically significant differences were found, it is a clear trend of increase as older the subjects ($r = 0.51$).

Conclusions: The increasing age of the man is associated with increased expression of apoptosis, as demonstrated by the increased expression of phosphatidylserine translocation at the Membrane. Thus, this study confirms that the subject's age is associated with a decline in some of the seminal parameters.

Key words: sperm, semen, apoptosis, annexin V, TUNEL, DNA fragmentation.

RÉSUMÉ

Antécédents: les processus biomoléculaires associés au vieillissement et à la mort cellulaire programmée pendant la spermatogenèse sont bien connus, mais pas leur transcendance biologique sur le sperme éjaculé, car on ignore le comportement de ces marqueurs apoptotiques en relation avec l'âge de l'homme.

Objectif: évaluer l'effet du vieillissement dans la capacité fonctionnelle du spermatozoïde et sa relation avec les processus de mort cellulaire programmée.

Matériel et méthode: étude prospective, transversale et analytique effectuée avec des échantillons séminaux de 25 hommes en bonne santé de 20 à 70 ans, qui ont été classés en deux groupes [(A: mineurs de 40 ans) et B: majeurs de 40 ans]]. On a évalué les paramètres séminaux OMS (1999) et les processus de transformation biomoléculaire de membrane et l'expression par oligonucléosomes dans la cascade terminale d'apoptose. On a quantifié au moyen de cytométrie en flux avec laser d'argon comme source de lecture à 480 nm, en discriminant les degrés de cellularité négative et positive pour chacun des indicateurs.

Résultats: le pourcentage de cellules vivantes avec translocation de phosphatidylsérine dans la membrane (anexine-V+/PI+) a été significativement supérieur chez les hommes majeurs de 40 ans ($p < 0.05$). Ces découvertes s'enrichissent avec une corrélation positive et significative ($r = 0.50$, $P < 0.008$), entre le biomarqueur précoce et l'âge des hommes. Quant à la fragmentation de l'ADN, malgré le fait de n'avoir pas trouvé de différences statistiquement significatives, on a observé une claire tendance d'augmentation selon la supériorité d'âge des hommes ($r = 0.51$).

Conclusions: l'augmentation de l'âge de l'homme est associée avec une augmentation dans l'expression des marqueurs d'apoptose, ce qui se démontre avec la majeure expression de la translocation de phosphatidylsérine au niveau de la membrane. Ainsi, cette étude confirme que l'âge de l'homme est associé avec un déclin dans quelques paramètres séminaux.

Mots-clés: spermatozoïde, sperme, apoptose, anexine V, TUNEL, fragmentation de l'ADN.

RESUMO

Antecedentes: Os processos biomoleculares associados com o envelhecimento e a morte celular programada durante a espermatogênese são bem conhecidos, mas não a sua transcendência biológica no esperma ejaculado, porque se ignora o comportamento dos marcadores apoptóticos na relação com a idade do homem.

Objetivo: Avaliar o efeito do envelhecimento com a capacidade funcional do espermatozoide e sua relação com os processos de morte celular programada.

Material e método: Estudo prospectivo, transversal e analítico efetuado com amostras seminais de 25 pessoas saudáveis de 20 a 70 anos de idade, que foram divididos em dois grupos: [(A: menores de 40 anos) e (B: maiores de 40 anos de idade)]. Foram avaliados os parâmetros seminais OMS (1999) e os processos de transformações biomoleculares de membrana e a expressão por oligonucleossomas na cascata terminal de apoptoses. Foram quantificados por meio de citometria de fluxo com laser de argon como fonte de leitura a 480 nm, discriminando os graus de celularidade negativa e positiva para cada um dos indicadores.

Resultados: A porcentagem de células vivas com inversão de fosfatidil serina na membrana (anexina-V+/PI+) foi significativamente superior nos homens com mais de 40 anos ($p < 0,05$). Esses achados foram enriquecidos com uma correlação positiva e significativa ($r = 0,50$, $P < 0,008$), entre o biomarcador precoce e a idade dos pesquisados. Com respeito a fragmentação do DNA, apesar de não encontrar diferenças estatisticamente significativas, foi observado uma tendência clara de aumento conforme mais velhos eram os pesquisados ($r = 0,51$).

Conclusões: O incremento da idade do homem é associado com o aumento da expressão de marcadores de apoptoses, o que se demonstra pela maior expressão da inversão de fosfatidil serina a nível de membrana. Assim, este estudo confirma que a idade do homem pesquisado se associa com um declive em alguns dos parâmetros seminais.

Palavras-chave: espermatozoide, sêmen, apoptoses, anexina V, TUNEL, fragmentação de DNA.

* Residente de Biología de la Reproducción Humana.

** Adscrita a la Dirección de Investigación.

*** Investigador en Salud Reproductiva.
Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes

**** Dirección del laboratorio de Gametos, Centro de Reproducción Asistida Nascere.

Correspondencia: Dr. Gerardo Barroso. Instituto Nacional de Perinatología, Torre de Investigación, quinto piso. Montes Urales 800, colonia Lomas de Virreyes, México 11000, DF. Correo electrónico: barrosog@me.com

Recibido: agosto, 2010. Aprobado: octubre, 2010.

* Artículo premiado con el primer lugar al trabajo científico Dr. Alfonso Álvarez Bravo presentado en el LXI Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia 2010, que se celebró en la ciudad de Chihuahua los pasados 26 al 30 de octubre.

Este artículo debe citarse como: Colin-Valenzuela A, Gómez-López N, Ávila-Lombardo R, Barroso-Villa G. Impacto del envejecimiento masculino en la capacidad funcional del espermatozoide a través de la expresión de fosfatidil serina y oligonucleomas. Ginecol Obstet Mex 2010;78(12):669-676.

Los procesos de muerte celular programada (apoptosis) se caracterizan por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan en degradación celular sin respuesta inflamatoria.^{1,2} Al igual que en otros procesos fisiológicos y patológicos los reproductivos no son ajenos a estas vías de activación, lo que repercute en la capacidad reproductiva de hombres y mujeres.

En los últimos años ha habido interés en la participación de estos procesos apoptóticos en la espermatogénesis y en el desarrollo espermático tardío, lo que se refleja en la capacidad reproductiva final.^{3,4} Está demostrado que las alteraciones en los procesos apoptóticos se asocian con infertilidad masculina y con una elevada frecuencia de apoptosis en células germinales de tejido testicular en pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa.^{5,6}

También se ha estudiado su participación en el espermatozoide maduro y en la calidad del semen eyaculado.⁷ Se ha correlacionado la activación de mecanismos apoptóticos con la calidad del semen,⁸ lo que sugiere que la identificación de marcadores apoptóticos puede ser un factor importante para evaluar la calidad seminal.

Para evaluar la expresión de la apoptosis en el espermatozoide existen diferentes técnicas que detectan el proceso apoptótico en etapas tempranas y las que lo detectan en etapas tardías. Uno de los métodos de detección temprana de apoptosis es la identificación de la fosfatidilserina en la capa externa de la membrana celular mediante la adición de anexina V, que es una proteína con afinidad por fosfolípidos dependientes de calcio, con alta afinidad por la fosfatidilserina, de modo tal que esta proteína indica el comienzo del proceso apoptótico.^{9,10}

La unión de anexina V con células apoptóticas puede detectarse con una tinción verde fluorescente con isotiocianato de fluoresceína que puede detectarse con citometría de flujo y microscopia fluorescente. A esta técnica se agrega yoduro de propidio, para obtener una tinción roja que diferencia las células necróticas de las viables con o sin translocación de fosfatidilserina.

Otra forma de identificar el proceso de apoptosis en etapas tempranas es mediante la detección de proteasas específicas de cisteína-aspartato o caspasas.¹¹ Éstas participan como transductores y efectores tempranos en las diferentes vías apoptóticas en células somáticas,¹² 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 decisivo en la transducción de señales intracelulares en las células destinadas a la muerte programada;¹³ su activación ocurre por proteólisis o debido a la acción de otras proteínas.¹⁴ La unión de Fas-ligando en la membrana celular y el incremento de Bax/Bcl2 en la membrana mitocondrial inician la activación de las caspasas 8 y 9, respectivamente.¹⁵

Una vez activadas estas caspasas, la señal se transduce a las caspasas efectoras, incluidas las caspasas 3, 6 y 7.¹⁵ Estas enzimas degradan los sustratos celulares, incluidas las proteínas estructurales citoplasmáticas, como actina y citoqueratinas o proteínas nucleares, como poli (ADP ribosa), polimerasas (PARP) y laminasas.¹⁶⁻¹⁹ Al parecer, la caspasa 3 activa una dioxirribonucleasa (CAD, también llamada factor-40 de fragmentación de ADN o nucleasa activada por caspasa), que participa en la fragmentación del ADN.²⁰⁻²² Por eso 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 fragmentan el ADN y, por lo tanto, la liberación de grupos hidroxilo 3'. Esta propiedad es utilizada por el método de TUNEL para identificar células apoptóticas al marcar las terminales 3' hidroxilo con nucleótidos de desoxiuridina trifosfato, con algún compuesto, como fluoresceína (isotiocianato de fluoresceína -dUTP).²³

La enzima terminal dioxinucleotidil transferasa (TdT) cataliza la adición independiente (isotiocianato de fluoresceína -dUTP) a las terminales 3' hidroxil del ADN, por lo que en las células apoptóticas hay un número sustancial de estos sitios para su identificación mediante el método de TUNEL.

En la estimulación de la cascada apoptótica en el espermatozoide maduro se han asociado diferentes factores: radiación, tabaquismo,²⁴ hipertermia testicular,^{25, 26} quimioterapia, radioterapia,^{27, 28} inflamación del conducto genital²⁹ y criopreservación^{30, 31} 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 en el eyaculado.³²

Por lo que se refiere a los parámetros seminales, se ha observado que conforme la edad del hombre aumenta, disminuye significativamente la movilidad, morfología, concentración y volumen. En lo que concierne a la búsqueda de la relación de marcadores apoptóticos con la edad,

se han realizado pocos estudios y algunos autores concluyen que ésta disminuye conforme más edad se tiene.³³ Además, ninguno de ellos evalúa diferentes marcadores en el mismo estudio y no relacionan las concentraciones séricas de las diferentes hormonas relacionadas con los procesos apoptóticos.

Es necesario realizar un estudio con citometría de flujo que cuantifique estos marcadores biológicos relacionados con la apoptosis para definir el impacto de estos en el esquema reproductivo. Se pretende correlacionar los niveles de apoptosis con la edad y determinar si existe relación de las hormonas al evaluarlas con el envejecimiento de los hombres.

El efecto deletéreo del gameto masculino ha mostrado tener una repercusión decisiva en los procesos reproductivos, por eso se la ha relacionado, incluso, en 50% de los casos de infertilidad.

Esto expresa alteraciones en la función espermática, génica y en la expresión de aneuploidias durante los procesos de fertilización. Existe un efecto 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.⁴³

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.

Puesto que es poco conocido el efecto de la edad en los parámetros seminales es necesario investigar si existe un efecto deletéreo en la transmisión de enfermedades génicas y cromosómicas relacionadas con el daño progresivo del espermatozoide y cuantificarlo por medio de marcadores apoptóticos de membrana y nucleares.⁴³

En los últimos años, varios investigadores han reportado decremento en los parámetros seminales de sujetos de edad avanzada.

Recientemente se descubrió la apoptosis en espermatozoides maduros y se relacionó, en mayor medida, con pacientes infértiles. Sin embargo, su relación con la edad no se había descrita con exactitud, además de que existe controversia en cuanto a los resultados observados. Por eso es necesario realizar un estudio en el que se analice, con métodos más exactos, la relación de la edad del hombre con la calidad seminal por medio del estudio apoptótico de los espermatozoides maduros.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo, transversal y analítico efectuado en el Instituto Nacional de Perinatología de marzo de 2008 a marzo de 2009 con muestras seminales de 25 sujetos sanos de 20 a 70 años de edad, que aceptaron participar en el estudio y que se dividieron en dos grupos [(A: menores de 40 años) y (B: mayores de 40 años de edad)]. Los sujetos de estudio tenían antecedente de fertilidad probada, espermocultivo negativo y no tenían enfermedades sistémicas.

Las muestras seminales se obtuvieron de pacientes voluntarios y se recolectaron con un periodo de abstinencia de 3 a 5 días. Se determinó su concentración, movilidad y morfología. Después de la licuefacción (30-45 minutos) de 5 µL de cada muestra se colocó en una cámara de Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) y se leyó en un microscopio de luz para motilidad y concentración espermática.

La morfología se evaluó de acuerdo con los criterios estrictos de Kruger. Cada muestra (10µL) se extendió en un portaobjetos y se dejó secar durante 20 minutos, antes de teñirse con la tinción Diff-Quick (Baxter Dade Diagnostics, Dubingen, Switzerland). Se leyeron, en promedio, 100 espermatozoides por extendido bajo microscopia de luz en un objetivo de inmersión 100X.

Finalmente, las muestras se conservaron a 37°C, 5% CO₂ en medio HFT y se analizaron, independientemente, para anexina V, anticuerpos anti-caspasa 3 y yoduro de propidio, además de método de TUNEL en la siguiente media hora.

Evaluación de la externalización de fosfatidil-serina con anexina V

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

Después de separar 10⁶ células de cada muestra (móvil y no móvil) se lavaron en PBS (buffer de solución salina fosfatada) y la muestra se centrifugó a 200 x g durante

cinco minutos. Las muestras se resuspendieron en 100 μ L de una solución con anexina-V marcada con fluoresceína y yoduro de propidio. La solución se prepara prediluyendo 20 μ de anexina-V-fluoresceína en 1 mL del buffer de incubación y 20 μ de la solución de yoduro de propidio. Se incuban durante 10-15 minutos a 15-25 °C.

Las muestras se analizan por citometría de flujo, previa adición de 0.5 mL de un buffer de incubación por 10^6 células. Las muestras se leen en el citómetro de flujo a 488 nm con un filtro de 515 nm para detectar anexina-V-fluoresceína y un filtro de más de 600 nm para detectar yoduro de propidio. Para evitar traslapaciones de los dos espectros emitidos se requiere compensación electrónica del instrumento.

Evaluación de apoptosis con 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 TUNEL es capaz de detectar este tipo de células mediante la adición de una enzima terminal de desoxinucleotidil transferasa (TdT) para la incorporación de desoxinucleótidos marcados con isotiocianato de fluoresceína.

Para realizar el método de TUNEL se requiere hacerlo en dos etapas (fijación y tinción) con un equipo APO-DIRECT. El equipo incluye 5 mL de suspensiones celulares control positivas y negativas, de aproximadamente 1×10^6 células por mL en etanol 70% (v/v). Las células control se derivan de una línea celular de linfoma humano y se fijan como las células muestra que enseguida se explica.

Fijación

Las células en PBS-paraformaldehído al 1% se resuspenden a una concentración de $1-2 \times 10^6$ células/mL y la suspensión celular se suspende en hielo durante 30-60 minutos. Después, las células se centrifugan durante 5 minutos a 300 x g y se desecha el sobrenadante. Después, las células se lavan en 5 mL de PBS y se centrifugan para obtener el paquete celular (este paso se realizará en dos ocasiones).

Posteriormente, el paquete celular se resuspende en el PBS residual mediante agitación moderada en vortex. La concentración celular se ajusta a $1-2 \times 10^6$ células/mL en etanol al 70% (v/v) frío y se mantiene durante un mínimo de 30 minutos. Finalmente, las células se almacenan en etanol al 70% (v/v) a -20°C hasta su uso.

Tinción y análisis

Las células control positivas y negativas (6552LZ, 6553LZ) se resuspenden en sus respectivos viales. Se toma una alícuota de 1 mL de la suspensión de las células control (aproximadamente 1×10^6 células/1 mL) y se coloca en tubos de 12 x 75 mm para citometría de flujo. Se centrifugan a 300 x g durante cinco minutos y el etanol al 70% (V/V) se remueve por aspiración, sin alterar el paquete celular. Cada tubo de células control se resuspende con 1 mL del buffer de lavado (6548AZ), se centrifuga a 300 x g durante cinco minutos y el sobrenadante se remueve.

El tratamiento de lavado se repite y después cada paquete celular control se resuspende con 50 μ L de la solución de tinción (el buffer de reacción para la enzima TdT contiene la enzima TdT, fluoresceína conjugada con dUTP [6549AZ, 6554EZ, 6555EZ] y agua destilada).

Enseguida, se incuban las células en la solución de tinción durante 60 minutos a 37 °C y, al finalizar el periodo de incubación, se añade 1 mL del buffer de enjuague (0.05% azida de sodio 6550AZ) a cada tubo. Se centrifuga a 300 xg durante cinco minutos y se remueve el sobrenadante por aspiración (en dos ocasiones). Enseguida, el paquete celular se resuspende en 0.5 mL del buffer de tinción, con yoduro de propidio/RNasa (6551AZ) y las células se incuban en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se analizan en la solución de yoduro de propidio/RNasa por citometría de flujo después de tres horas de haber concluido la tinción.

El análisis estadístico se realizó con 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 Kruskal Wallis, según fuera apropiado. Las correlaciones se determinaron con rho de Spearman y regresiones logísticas simples.

RESULTADOS

Para el análisis las muestras seminales se dividieron en dos grupos: *A*: hombres menores de 40 años y *B*: mayores de 40 años de edad, con promedio de edad para el primer grupo de 28 ± 3 años de edad y para el segundo grupo de 54 ± 8 años de edad.

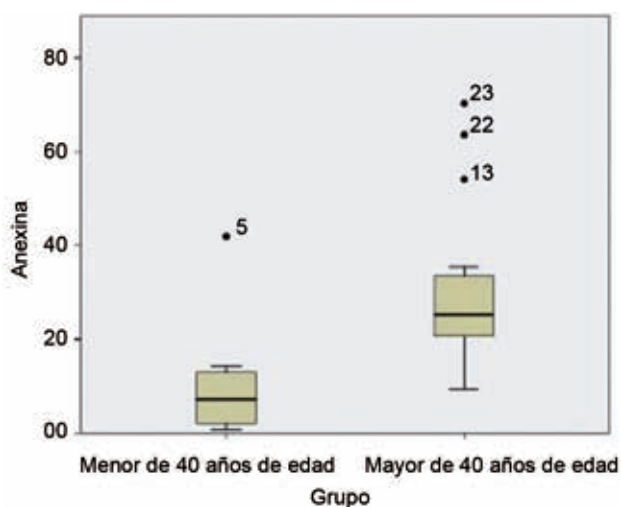
En el Cuadro 1 se presentan los parámetros seminales básicos. Se encontraron diferencias significativas entre

Cuadro 1. Parámetros seminales

		Media	Desviación estándar	P
Movilidad A	Menor 40 años	11.818	9.3895	.05
	Mayor 40 años	5.867	5.8538	
Movilidad B	Menor 40 años	64.2727	25.74137	NS
	Mayor 40 años	61.1333	25.18182	
Movilidad C	Menor 40 años	16.5455	32.11344	NS
	Mayor 40 años	5.6667	3.97612	
Movilidad D	Menor 40 años	7.4545	9.37405	NS
	Mayor 40 años	22.6000	25.11346	
Morfología	Menor 40 años	8.73	3.289	NS
	Mayor 40 años	6.73	2.492	
Concentración	Menor 40 años	74.000	48.4624	NS
	Mayor 40 años	50.133	39.0400	
Volumen	Menor 40 años	.8182	.25226	NS
	Mayor 40 años	.8333	.24398	

Cuadro 2. Marcadores de apoptosis

Marcador	Grupo	Promedio	Desviación estándar	P
Tunel	Menor 40	19.0273	14.9	NS
	Mayor 40	26.7267	16.7	
Anexina	Menor 40	9.8455	11.7	.002
	Mayor 40	30.7000	18.2	

**Figura 1.** Celularidad positiva para anexina V en sujetos mayores y menores de 40 años de edad.

los grupos de movilidad espermática rápida progresiva ($p < 0.05$), con un declive obvio conforme se incrementa la edad. En el resto de los parámetros no se alcanzó significación estadística; sin embargo, sí se observa una tendencia a su decremento conforme avanza la edad. Estos resultados 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.

La expresión de biomarcadores de apoptosis se determinó mediante citometría de flujo y se recabaron los porcentajes de células anexina V+.

Para los marcadores de apoptosis se encontró una diferencia significativa para la expresión de anexina. Para la determinación de fragmentación del ADN se observó una clara tendencia al aumento de su expresión en hombres mayores de 40 años de edad; sin embargo, no se alcanzó la significación estadística para estos biomarcadores. Sus promedios se incluyen en el Cuadro 2.

En la Figura 1 se esquematiza mediante un gráfico de caja y bigote la celularidad positiva para anexina V.

CONCLUSIONES

La evaluación del espermatozoide estaba limitada a su observación en muestras “crudas” o sometidas a un proceso de capacitación. Las conclusiones de esa evaluación indicaban un deterioro de los parámetros seminales (movilidad, concentración, morfología) conforme mayor es la edad del hombre; esas observaciones coinciden con las encontradas en este estudio.^{34-37, 42}

En la última década se han evaluado los estudios realizados para valorar la funcionalidad en los procesos relacionados con el componente espermático a través de la expresión de marcadores apoptóticos.^{38,39,40} Esto ha mostrado que los procesos tempranos y tardíos influyen no solo en la capacidad de fertilización, proceso preimplantatorio y desarrollo embrionario, sino también en la transmisión de enfermedades génicas relacionadas con alteraciones en el cromosoma Y.

Hoy se sabe que la evaluación en el grado de fragmentación de ADN en el espermatozoide tiene una repercusión directa en los procesos de fertilización, lo que ha quedado demostrado clínicamente en pacientes con inseminación intrauterina, fertilización *in vitro* e inyección intracitoplasmática.^{41,42}

Para el reconocimiento de la activación de la cascada apoptótica en el espermatozoide se han descrito varios procedimientos, como la traslocación de fofatidil serina, activación de caspasas (fas ligando de fas, caspasa 3 activada) y formación de oligonucleosomas. Todos estos han sido auxiliares diagnósticos en la evaluación de la función del espermatozoide.¹¹⁻¹⁵

Sin embargo, la mayor parte de los hallazgos mencionados se encontró y evaluó en población masculina infértil y en edad reproductiva. Por eso el objetivo de este estudio fue analizar el comportamiento de dos marcadores de apoptosis en sujetos fértiles y su comportamiento conforme se incrementa la edad.

En la bibliografía revisada no se encontró un 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 mayor expresión de marcadores de apoptosis temprana, y al parecer 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, sí se observa una tendencia hacia su incremento en los hombres mayores de 40 años.

La importancia de lo anterior radica en el conocimiento actual de la disfunción del espermatozoide como la causa más frecuente de infertilidad. Sin embargo, el diagnóstico patogénico y fisiopatológico es pobre. Si se excluyen las TRA no hay, en general, tratamiento adecuado.⁴³ La información genética provista por el espermatozoide está regulada a distintos niveles epigenéticos, incluidas las modificaciones del ADN mediante impronta, códigos de histonas y zonas asociadas, y quizá 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 se dirija 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, incluidas las posibles repercusiones en los procesos de implantación, placentación y la salud de la progenie.

Por último, consideramos que para darle mayor fuerza a estos resultados, resultaría prudente incrementar el tamaño de la muestra y analizar el comportamiento de marcadores apoptóticos seminales, determinados de forma longitudinal.

REFERENCIAS

1. Kerr J, Wyllie A, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
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, et al. 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;28:587-596.
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, et al. 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;281:1312-1316.
12. Wolf B, Green D. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999;274:20049-20052.
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, et al. 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 α -converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:8395-8400.

20. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, et al. 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* 1998;95:8461-8466.
22. Halenbeck R, MacDonald H, Roulston A, Chen TT, et al. 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; 423:103-111.
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;129:505-514.
27. Morris I. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002;25:255-261.
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;23:717-723.
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;47:980-984.
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;80:1420-1430.
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* 2000;79:1520-1527.
37. Chen Z, Toth T, Godfrey L, Mercedat N, et al. 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, et al. 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, et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril* 2009;92:835-848.