



Efecto de la merocianina-540 en la capacidad fertilizante del espermatozoide correlacionada con la expresión de fragmentos 3-OH terminales*

Gerardo Barroso-Villa,* Alinne Colin-Valenzuela,** Nardhy Gómez-López,*** Mauricio Velázquez-Magaña****

Nivel de evidencia: II-1

RESUMEN

Antecedentes: el empaquetamiento de la heterocromatina durante la espermatogénesis ha sido correlacionado con la expresión de cuerpos apoptóticos residuales (que tiñen con merocianina A) que impactarán en la función espermática, en el proceso de fertilización, así como en la expresión conjunta de la traslocación transmembranal de fosfatidil serina y oligonucleosomas.

Objetivo: evaluar la expresión de cuerpos teñidos con merocianina en los procesos funcionales del espermatozoide y su grado de concordancia con biomarcadores apoptóticos Anexina V y TUNEL.

Material y método: se realizó un estudio prospectivo, transversal, incluyéndose once mil células pertenecientes a muestras seminales de hombres infértiles; se evaluaron de acuerdo a los criterios 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 fueron 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: por diseño de estudio se encontró una baja cuantificación en los parámetros seminales, movilidad, morfología y concentración espermática. La expresión promedio de células [DNA-PI(+)/dUTP-FITC(+)] (cuantificación de TUNEL) y [Annexin-V(+)/PI(-)] fue de $36.5 \pm 17.4\%$ y $31.2 \pm 17.4\%$ respectivamente. Al comparar la expresión de TUNEL sin el efecto de los cuerpos M540 ($36.3 \pm 1.7\%$ vs $36 \pm 1.7\%$) no se determinó una diferencia significativa.

Conclusiones: con este estudio se demuestra que existe remanente de los procesos primarios de espermiación los cuales pueden participar de forma importante en los procesos apoptóticos y funcionales del espermatozoide, sin embargo su expresión no repercute en la medición de biomarcadores de apoptosis seminales cuya determinación ha venido a modificar la percepción diagnóstica y funcional de los parámetros reproductivos en el espermatozoide.

Palabras claves: espermatozoide, cuerpos apoptóticos, merocianina, apoptosis, TUNEL, Anexina V.

ABSTRACT

Background: The packaging of heterochromatin during spermatogenesis has been correlated with the expression of residual apoptotic bodies (which stain with merocyanine A) that will impact on sperm function in the fertilization process; as well as the joint expression of the transmembrane translocation phosphatidyl serine and oligonucleosomes.

Objective: To evaluate the expression of bodies stained with merocyanine in the functional processes of sperm and their level of agreement with apoptotic Annexin V and TUNEL biomarkers.

Material and method: We performed a prospective, cross, including 11,000 cells belonging to semen samples from infertile men, were evaluated according to WHO criteria (1999), bounded by the lines of Tygerberg. The biomolecular transformation processing of the membrane and the expression of oligonucleosomes in the terminal cascade of apoptosis were quantified by cytometry flow, using an argon laser as a reading source of 480 nm, discriminating the degree of cellularity, both negative and positive for each indicators.

Results: Because of the study design was found low quantification in semen parameters, motility, morphology and sperm concentration. The average expression of cells [DNA-PI(+)/dUTP-FITC(+)] (quantification of TUNEL) and [Annexin-V(+)/PI(-)] was $36.5 \pm 17.4\%$ and $31.2 \pm 17.4\%$, respectively. By comparing the expression of TUNEL without the effect of M540 bodies ($36.3 \pm 1.7\%$ vs $36 \pm 1.7\%$) a significant difference was not determined.

Conclusions: This study shows that there is a remnant of the primary processes of spermiation, which can take an important role in apoptotic and functional processes of the sperm. However, its expression does not affect measurement of biomarkers of apoptosis seminal, whose determination changed the diagnosis and functional perception of reproductive parameters in the sperm.

Key words: sperm, apoptotic bodies, merocianina, apoptosis, TUNEL, Annexin V.

RÉSUMÉ

Antécédents: l'emballage de l'hétérochromatine pendant la spermatogenèse a été lié avec l'expression de corps apoptotiques résiduels (teints avec mérocyanine A) qui ont une répercussion sur la fonction spermatique, sur le processus de fertilisation et sur l'expression conjointe de la translocation transmembranale de phosphatidylsérine et oligonucléosomes.

Objectif: évaluer l'expression de corps teints avec mérocyanine dans les processus fonctionnels du spermatozoïde et son degré de concordance avec biomarqueurs apoptotiques annexine V et TUNEL.

Matériel et méthode: étude prospective, transversale effectuée avec 11,000 cellules des échantillons séminaux d'hommes infertiles. On a évalué avec les critères de l'OMS (1999) et on les a délimités avec les tendances de Tygerberg. Les processus de transformation biomoléculaire de membrane et l'expression par oligonucléosomes dans la cascade terminale d'apoptose ont été quantifiés avec cytométrie en flux et un laser d'argon comme source de lecture à 480 nm. Pour chacun des indicateurs on a discriminé les degrés de cellularité négative et positive.

Résultats: par le dessin de l'étude, on a trouvé une faible quantification dans les paramètres séminaux: mobilité, morphologie et concentration spermatique. La moyenne d'expression des cellules [DNA-PI⁽⁺⁾/dUTP-FITC⁽⁺⁾] (quantification de TUNEL) et [Annexine-V⁽⁺⁾/PI⁰] a été de $36.5 \pm 17.4\%$ et $31.2 \pm 17.4\%$, respectivement. Au moment de comparer l'expression de TUNEL sans l'effet des corps M540 ($36.3 \pm 1.7\%$ vs $36 \pm 1.7\%$), on n'a pas déterminé de différence significative.

Conclusions: cette étude montre qu'il existe un rémanent des processus primaires de spermiation, qui peuvent participer de manière significative dans les processus apoptotiques et fonctionnels du spermatozoïde. Toutefois, leur expression n'a pas d'effets sur le mesurage de biomarqueurs d'apoptoses séminales, dont la détermination a modifié la perception diagnostique et fonctionnelle des paramètres reproductifs dans le spermatozoïde.

Mots-clés: spermatozoïde, corps apoptotiques, mérocyanine, apoptose, TUNEL, annexine V.

RESUMO

Antecedentes: O empacotamento da heterocromatina durante a espermatogênese é correlacionado com a expressão de corpos apoptóticos residuais (que tem com merocianina A) que tem repercussão com a função espermatática no processo de fertilização e a expressão conjunta da inversão transmembranar de fosfatidil serina e oligonucleossomas.

Objetivo: Avaliar a expressão de corpos pintados com merocianina nos processos funcionais do espermatozóide e seu grau de concordância com biomarcadores apoptóticos anexina V e TUNEL.

Material e método: Estudo prospectivo, transversal efetuado com 11,000 células de amostras seminais de homens inférteis. Foram avaliados com critérios da OMS (1999) e apontaram com os lineamentos de Tygerberg. Os processos de transformações biomolecular de membranas e a expressão por oligonucleossomas na cascata terminal de apoptoses se quantificaram com a citometria de fluxo e um laser de argon como fonte de leitura a 480 nm. Para cada um dos indicadores foram discriminados os graus de celularidade negativa e positiva.

Resultados: Através do estudo se encontrou uma baixa quantificação nos parâmetros seminais: mobilidade, morfologia e concentração espermatática. A expressão média das células [DNA-PI⁽⁺⁾/dUTP-FITC⁽⁺⁾] (quantificação de TUNEL) e [Annexin-V⁽⁺⁾/PI⁽⁺⁾] foi de $36,5 \pm 17,4\%$ e $31,2 \pm 17,4\%$, respectivamente. Ao comparara a expressão de TUNEL sem o efeito dos corpos M540 ($36,3 \pm 1,7\%$ vs $36 \pm 1,7\%$) não determinou uma diferença significativa.

Conclusões: Este estudo demonstra que existe um remanente dos processos primários de espermição, que podem participar de maneira importante nos processos apoptóticos e funcionais do espermatozóide. Entretanto, sua expressão não repercute na mediação dos biomarcadores de apoptoses seminais, cuja determinação modificou a percepção diagnóstica e funcional dos parâmetros reprodutivos no espermatozóide.

Palavras-chave: espermatozóide, corpos apoptóticos, merocianina, apoptoses, TUNEL, anexina V.

* Investigador en Salud Reproductiva.

** Residente de Biología de la Reproducción Humana.

*** Adscrita a la Dirección de Investigación.

Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

**** Cuerpo médico, Centro Médico ABC.

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: octubre, 2010. Aceptado: noviembre, 2010.

* Artículo premiado con el tercer 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: Barroso-Villa G, Colin-Valenzuela A, Gómez-López N, Velázquez-Magaña M. Efecto de la merocianina-540 en la capacidad fertilizante del espermatozoide correlacionada con la expresión de fragmentos 3-OH terminales. Ginecol Obstet Mex 2010;78(12):685-691.

Durante los últimos años se ha mostrado una disminución progresiva en la capacidad reproductiva tanto en hombres como en mujeres, lo cual ha conllevado a un incremento en la demanda de los servicios para la atención de problemas reproductivos.

De igual forma el estudio del espermatozoide ha adquirido un papel importante en la evaluación de los procesos reproductivos, en donde sus capacidades están relacionadas no solo con los procesos de fertilización y desarrollo embrionario, sino también con los fenómenos de placentación así como con aquellos relacionados con procesos restrictivos derivados de la vasculogénesis, transporte y nutrición placentaria.¹

Es de reciente interés el estudio de los procesos de muerte celular programada en las células germinales, así los procesos apoptóticos caracterizados por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan en la eliminación de las células sin la presencia de una respuesta inflamatoria. Así se ha concluido que estos eventos, no resultan reproductivos impactando en sus vías de activación, lo cual repercutirá en la capacidad reproductiva tanto en el hombre como en la mujer.²⁻⁴

Para tener una fertilización exitosa se requiere de una membrana plasmática íntegra y funcional en el espermatozoide, dicha membrana tendrá una participación fundamental en el metabolismo celular para mantener la motilidad espermática, durante el proceso de capacitación, reacción acrosomal y durante la interacción con el gameto femenino.^{5,6}

En el caso de que esta membrana sufra alguna alteración, la fase inicial de su daño se caracterizara por una pérdida en la simetría de los fosfolípidos de membrana que resulta de la traslocación de la fosfatidilserina (FS) de la capa interna a la externa, fenómeno que resulta característico del inicio de la apoptosis celular. Para la identificación de este fenómeno, se utiliza a la Anexina V la cual es una proteína que muestra afinidad por los fosfolípidos dependientes de calcio, como es la FS así la unión de anexina V a células apoptóticas se detecta a través de una tinción verde fluorescente con isotiocinato de fluoresceína (FITC) señal que se detecta mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia.^{7,8}

Las fases tardías de la apoptosis se caracterizan por la fragmentación del ADN y resulta de la activación de las endonucleasas endógenas, generando una multitud de grupos 3' hidroxilo, lo anterior puede ser determinado mediante el llamado método de TUNEL el cual identificara a

las células apoptóticas marcando las terminales 3' hidroxilo con nucleótidos de desoxiuridina trifosfato, adicionado a FITC, reacción que es catalizada por la enzima terminal desoxinucleotidil transferasa (TdT), procesos que son cuantificados mediante el uso de citometría de flujo.⁹⁻¹¹

Recientemente se han identificado en el semen humano, cuerpos de forma redonda con diferentes tamaños y densidades a los cuales se les ha denominado cuerpos M540 debido a que se tiñen con fluorocromo de merocianina, la cual es un compuesto lipofílico que es sensible a los cambios en la arquitectura de la membrana tal y como ocurre durante la apoptosis de las células somáticas.¹² Se ha identificado que estos cuerpos expresan marcadores apoptóticos que ocurren durante la apoptosis testicular tales como caspasas, Fas, p53, Bcl-x, fragmentación del ADN y también presentan ubiquitinación.¹³⁻¹⁵

El origen de dichos cuerpos no ha sido bien definido, pero se ha propuesto que pudieran ser remanentes citoplasmáticos desprendidos un incremento de estos cuerpos en el espermatozoide, sin embargo estos cuerpos también podrían derivar de otros tipos celulares que se encuentran en apoptosis en el tracto genital masculino y se ha observado un incremento de estos cuerpos en el semen de pacientes con alteraciones seminales.¹⁶

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

De este modo, se ha concluido que la apoptosis tiene una participación importante en la espermatogénesis, siendo un mecanismo fundamental en el desarrollo del espermatozoide y clínicamente sus alteraciones se han vinculado con la infertilidad masculina lo anterior sustentado por la demostración de una correlación negativa entre la presencia de apoptosis en el espermatozoide maduro y la calidad seminal.¹⁷ Así se ha sugerido que la identificación de marcadores apoptóticos, puede ser un factor importante para la evaluación de la calidad del semen.¹⁸

Con este trabajo se pretende identificar el impacto de los cuerpos teñidos con merocianina, en la determinación de marcadores apoptóticos en hombres infértiles.

MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología de marzo del 2008 a marzo del 2009, se incluyeron

11 sujetos en edad reproductiva, que aceptaron participar en el estudio, y que estuvieran en protocolo de estudio en el servicio de reproducción asistida, debiendo contar con, espermocultivo negativo y carecer de enfermedades sistémicas.

Las muestras seminales obtenidas de los pacientes voluntarios se recolectaron con un periodo de abstinencia de 3 a 5 días, se determinó concentración, movilidad y morfología. 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 (10 µl) 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% CO₂ en medio HFT y serán analizadas independientemente para Anexina V, y Ioduro de propidio (IP) 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. IP (tinción roja) será agregado para diferenciar células viables de las necróticas, permitiendo diferenciar las células con translocación de FS que están muertas y después aquellas vivas con y sin translocación de FS.

Después de la separación, se lavarán 10⁶ células de cada muestra (móvil y no móvil) en PBS (buffer de solución salina fosfatada) y se centrifugará la muestra a 200 x g por 5 minutos. Las muestras serán resuspendidas en 100 µl de una solución que contendrá Anexina-V marcada con fluoresceína además de IP (la solución se prepara prediluyendo 20 µ de Anexina-V-fluoresceína en 1 ml del buffer de incubación adicionando 20 µ de la solución de IP) y se incubarán por 10-15 minutos a una temperatura de 15-25 °C.

Finalmente, las muestras serán analizadas por citometría de flujo previa adición de 0.5 ml de un búffer de incubación por 10⁶ 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. 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 x 10⁶ 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 x 10⁶ células/ml y colocar la suspensión celular en hielo por 30-60 min. Después, se centrifugarán las células durante 5 min a 300 x 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 x 10⁶ 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°C hasta su uso.

Tinción y análisis

Se resuspenden 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 x 10⁶ células/1 ml) y se colocarán en tubos de 12 x 75 mm para citometría de flujo. Se centrifugarán a

300 x 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 x 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 µl 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 °C y al finalizar el periodo de incubación se añadirá 1 mL del búffer de enjuague (0.05% Azida de Sodio 6550AZ) a cada tubo, se centrifugará a 300 x 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.

Protocolo de tinción para merocianina: las muestras previamente fijadas se tiñen con merocianina y son detectados previa incubación en solución (13.5 µM preparada en dimetilsulfoxido) durante 15 minutos a 37 °C y con 5% de CO₂, posteriormente las células se lavan con PBS 1X, a la par se preparo un control negativo omitiendo la adición de TDT. Después se realiza 2 lavados consecutivos con la finalidad de detener la reacción anterior, por ultimo las células se analizan por citometría de flujo en una tinción buffer PI/RNasa, para la citometría (Beckman Coulter, USA) las muestras son procesadas a FC 500 usando lasser de Argón a 480nm.

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.

RESULTADOS

Las muestras seminales se clasificaron de acuerdo con los parámetros descritos por la OMS (1999),¹⁹ las alteraciones seminales encontradas fueron las siguientes: oligoteratozoospermia (n = 1), oligoastenoteratozoospermia (n = 2),

astenoteratozoospermia (n = 4) y teratozoospermia (n = 4), los resultados de los parámetros seminales convencionales se ilustran en el Cuadro 1. La media de la edad de los pacientes fue de 31.4 ± 2.5 años.

Cuadro 1. Parámetros seminales convencionales

	<i>Promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>
Concentración (x 10 ⁶ /mL)	46.81	37.287
Morfología (%)	3.00	2.645
Movilidad (%)	11.82	20.272
Volumen (mL)	3.26	1.598

El total de células analizadas mediante citometría de flujo fue de 10x10⁶ células. En la determinación de apoptosis temprana células [Annexin-V⁽⁺⁾/PI⁽⁻⁾], el promedio fue de 31.2 ± 17.4%. Para la apoptosis tardía (TUNEL) [DNA-PI⁽⁺⁾/dUTP-FITC⁽⁺⁾] fue de 36.5 ± 17.3%.

La expresión de positividad para merocianina fue de 0.25 ± 0.18%.

La fragmentación del ADN determinada con el método de TUNEL empleando IP para descartar los cuerpos M540 en las muestras seminales fue de 36.3 ± 17.3. Por último la contribución de los cuerpos M540 en la aplicación del método de TUNEL no fue significativa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de células positivas para TUNEL con y sin efecto de los cuerpos M540

	<i>Promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>
TUNEL (%)	36.3	17.3
TUNEL M540 (%)	36	1.73
<i>p</i>	NS	

La figura 1 corresponde a un histograma, en el cual se muestran las diferentes poblaciones seminales caracterizadas por citometría de flujo.

CONCLUSIONES

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.¹⁷ Esto nos ha mostrado que procesos tanto tempranos como tardíos influyen no solo en la capacidad de fertilización, proceso preimplantatorio

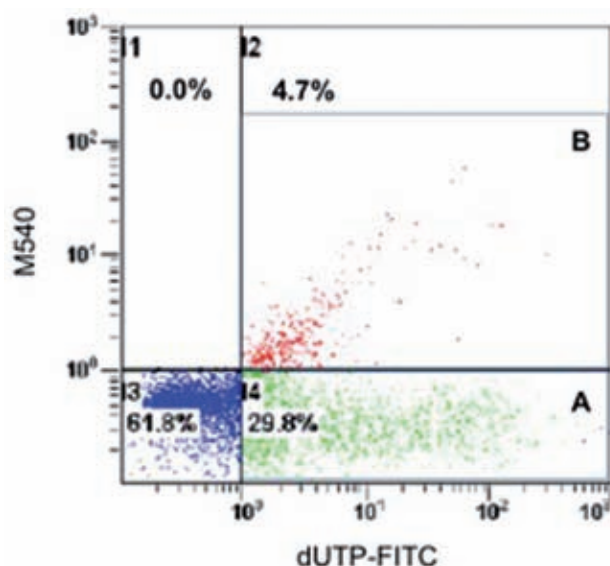


Figura 1. Ilustra un ejemplo de citometría de flujo en donde aparece un histograma que representa lo siguiente: células cells [DNA-PI(+)/dUTP-FITC(-)/M540(-)] que representan células viables 61.8%, [DNA-PI(+)/dUTP-FITC(+)] representando apoptosis tardía 29.8%, las células [DNA-PI(+)/M540(+)] 4.7% ilustran cuerpos M540, en esta técnica el IP para etiquetar el ADN celular.

y desarrollo embrionario, sino también en la transmisión de enfermedades génicas relacionadas a alteraciones en el cromosoma Y.²⁰

Estudios recientes han descrito la presencia de elementos en el líquido seminal que comparten características relacionadas con los cuerpos apoptóticos y que una de estas características es la sobreexpresión de marcadores apoptóticos.¹⁰

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 intrauterina,²¹ fertilización *in vitro*²¹ 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.^{22,23}

En un ensayo Muratori et al,¹⁰ encontraron la presencia de elementos de captación de merocianina A (M540),

posteriormente Marchianiy et al,¹² demostraron el impacto de la expresión de estos marcadores en la expresión de apoptosis. Con base en la experiencia obtenida en trabajos previos, hemos señalado la importancia de estos marcadores en el espermatozoide.^{14,22}

Por lo que llevamos a cabo este estudio, con el objetivo de evaluar el efecto de falsa positividad de los marcadores tempranos y tardíos y la adición de la tinción M540 para buscar diferencias en la determinación de marcadores de apoptosis, por efecto de cuerpos teñidos con merocianina que pudieran alterar la medición de dichos marcadores.

Como era de esperarse por el diseño del estudio se encontraron diferencias significativas en la determinación de parámetros seminales. Como ya habíamos señalado en trabajos previos hubo diferencias significativas en la expresión de TUNEL y Anexina V.

REFERENCIAS

1. Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendano C et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril* 2009;92:835-48.
2. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1338-44.
3. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000;73:43-50.
4. Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8:984-91.
5. Mower DA, Jr., Peckham DW, Illera VA, Fishbaugh JK, Stunz LL, Ashman RF. Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis. *J Immunol* 1994;152:4832-42.
6. Rath R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 2001;65:462-70.
7. Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003;7:469-76.
8. Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gavino F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 2006;85:149-54.
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;15:1338-44.

10. Muratori M, Marchiani S, Maggi M, Forti G, Baldi E. Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci* 2006;11:1491-9.
11. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 2009;74:789-93.
12. Marchiani S, Tamburrino L, Maoggi A, Vannelli GB, Forti G, Baldi E *et al*. Characterization of M540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies. *Mol Hum Reprod* 2007;13:621-31.
13. Henkel R, Maass G, Jung A, Haidl G, Schill WB, Schuppe HC. Age-related changes in seminal polymorphonuclear elastase in men with asymptomatic inflammation of the genital tract. *Asian J Androl* 2007;9:299-304.
14. Muratori M, Marchiani S, Criscuoli L, Fuzzi B, Tamburino L, Dabizzi S *et al*. Biological meaning of ubiquitination and DNA fragmentation in human spermatozoa. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;63:153-8.
15. Oldereid NB, Angelis PD, Wiger R, Clausen OP. Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. *Mol Hum Reprod* 2001;7:403-8.
16. Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl* 2004;25:797-810.
17. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005;11:337-49.
18. Marchiani S, Tamburrino L, Forti G, Baldi E, Muratori M. M540 bodies and their impact on flow cytometric analyses of human spermatozoa. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;65:509-14.
19. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge University Press, 1999.
20. Durakbasi-Dursun HG, Zamani AG, Kutlu R, Gorkemli H, Bahce M, Acar A. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoteratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. *Fertil Steril* 2008;89:1709-17.
21. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002;17:3122-8.
22. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31-7.
23. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C *et al*. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:830-9.