

ESTANDARDITZACIÓ DE LA TÈCNICA DE TUNEL EN ESPERMATOZOIDES. ANÀLISI DE FACTORS QUE PUGUIN PROVOCAR VARIACIONS EN ELS RESULTATS

David Domínguez,¹ María Isabel Camejo,² José Luís Balleascà,³ Cristóbal Mezquita,⁴ Rafael Oliva^{1*}

¹ Laboratori de Genètica Humana. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.

Casanova, 143. 08036 Barcelona. Tel. 934 021 877. Fax 934 035 260. Adreça electrònica: oliva@medicina.ub.es.

² Departamento de Biología de Organismos. Universidad Simón Bolívar.

Baruta, Estado Miranda. Venezuela. Tel. 58-212-9063077. Adreça electrònica: mcamejo@usb.ve.

³ Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia. Hospital Clínic de Barcelona.

Villarroel, 170. 08036 Barcelona. Tel. 932 279 763. Adreça electrònica: balleasca@clinic.ub.es.

⁴ Laboratori de Genètica Molecular. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.

Casanova, 143. 08036 Barcelona.

Resum

S'ha descrit una associació entre la fragmentació al DNA dels espermatozoides i la incidència de fracàs reproductiu. Actualment, l'anàlisi rutinària del semen en els laboratoris de reproducció assistida inclou paràmetres com el recompte, mobilitat o morfologia dels espermatozoides, però no l'anàlisi de la integritat del DNA. Un dels mètodes per a l'anàlisi de la integritat del DNA és el TUNEL. L'objectiu del treball ha estat estandarditzar si existeixen diferències entre el nombre d'espermatozoides positius per TUNEL en les següents condicions: *a*) avaluació per microscopia òptica o per citometria de flux, *b*) forma de seleccionar per citometria de flux la població d'espermatozoides, *c*) depenent del moment d'avaluació i forma de conservació de la mostra. Es va observar una correlació positiva entre els valors d'espermatozoides TUNEL positiu en ser avaluats per microscòpia de fluorescència i per citometria de flux. Quant a l'efecte sobre el percentatge d'espermatozoides TUNEL positiu després del procés de refrigeració a 4° C i congelació a -20° C es va observar que ambdós processos augmentaren de forma important la fragmentació del DNA. Els resultats d'aquest treball demostren la necessitat d'estandarditzar la tècnica TUNEL en espermatozoides, tant per a recerca com per a l'anàlisi de rutina dins dels laboratoris de reproducció assistida.

Paraules clau TUNEL, espermatozoides, citometria de flux, fragmentació DNA, infertilitat.

Abstract

TUNEL assay standardization in spermatozoa. Analysis of factors that may result in variation in the results.

An association between DNA fragmentation in the spermatozoa and incidence of reproductive failure has been described. At present the routine analysis of semen samples in assisted reproduction laboratories includes parameters such as count, mobility and morphology, but not analysis of the integrity of DNA. One of the methods to analyze DNA integrity is TUNEL. The objective of the present work is to standardize if there are differences in the number of TUNEL positive spermatozoa depending on the following conditions: 1. evaluation by optical microscopy or by cytometry, 2. procedure to select the population of spermatozoa in the analysis by cytometry, 3. timing of determinations and procedure to preserve samples. A positive correlation has been detected in the TUNEL results derived from cytometry or microscopy. The percentage of TUNEL positive spermatozoa increases substantially upon maintenance of the samples at 4° C or -20°C. The results from this work indicate the importance to standardize TUNEL assays either for research purposes or towards the routine analysis in assisted reproduction laboratories.

Key words TUNEL assay, spermatozoa, flow cytometry, DNA fragmentation, infertility.

INTRODUCCIÓ

En els últims anys han tingut lloc avenços molt importants en les tècniques de reproducció assistida per a ajudar les parelles amb problemes d'infertilitat. La utilització de tècniques com la injecció intracitoplasmàtica de l'espermatozoide (ICSI) han suposat un gran avenç en aquest sentit. No obstant això, en aquesta tècnica se selecciona l'espermatozoide d'acord amb la seva morfologia i motilitat però sense conèixer la seva qualitat biològica. És a dir, amb aquesta tècnica, s'eludeixen molts dels processos naturals de selecció de l'espermatozoide.

La selecció basada en morfologia i motilitat tampoc no té en compte la composició proteica o la integritat en el nucli de l'espermatozoide. L'espermatogènesi és un procés en què tenen lloc grans canvis en la composició de la cromatina (Mezquita, 1985; Roca i Mezquita, 1989; Oliva i Dixon, 1991). Alteracions en els nivells de protamina P2 s'han descrit en diversos pacients infèrtils (Balhorn, 1988; de Yebra, 1993). Els mecanismes implicats en el manteniment de la integritat en el genoma i la seva correlació amb els canvis de composició dels espermatozoides humans tampoc no són del tot coneguts.

A més s'ha observat que hi ha una associació entre la fragmentació al DNA dels espermatozoides i una major incidència de fracàs en la fertilització. També s'especula que podria produir danys al fetus i càncer en nounats (Fraga *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 1997; Sorahan *et al.*, 1997). Per això es fa necessari el desenvolupament de noves tècniques que consideren altres paràmetres no avaluats en l'espermatograma convencional, com és el dany al DNA.

Existeixen diferents metodologies per a avaluar el dany al DNA. Una de les més àmpliament estudiades és la tècnica del TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated dUTP [deoxyuridine triphosphate] nick end labeling*), que avalua la fragmentació del DNA, en ser capaços els dUTP marcats d'unir-se als trencaments del fil de DNA gràcies a la presència de l'enzim TdT. S'ha tractat de considerar el test de TUNEL com una mesura de la qualitat del semen en els laboratoris de reproducció assistida (Oosterhuis *et al.*, 2000). Per això seria primer necessari l'estandardització de la tècnica perquè els resultats siguin comparables entre els diferents laboratoris.

Entre els aspectes a estandarditzar es troba determinar si existeixen diferències entre el nombre d'espermatozoides positius per TUNEL en les següents condicions: *a*) depenent si la mostra s'avalua per microscopia òptica o per citometria de flux, *b*) forma de seleccionar per citometria de flux la població d'espermatozoides que serà avaluada, per exemple, per forma

(SSC) i mida (FSC) o per positivitats per iodur de propidi (IP), *c*) depenent del moment d'avaluació de la mostra: immediata o conservació en la fase de permeabilització de la tècnica de TUNEL a 4° C i -20° C. En aquest treball es presenten els resultats de l'avaluació de les mostres per TUNEL en les condicions anteriorment presentades.

MATERIALS I MÈTODES

Recollida i preparació de les mostres

Un total de quinze mostres de semen van ser recollides de l'Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. Les mostres de semen van ser recollides després d'almenys una abstinència sexual de quaranta-vuit hores. Després de trenta minuts de líquüefacció les mostres es preparen per a poder ser avaluades per la tècnica de TUNEL.

Assaig de TUNEL

Una quantitat de semen equivalent a $7,5 \times 10^6$ espermatozoides van ser rentats per centrifugació dues vegades a 800 g durant cinc minuts amb PBS/BSA 1 % per a cadascuna de les condicions a avaluar. Un cop fets els rentats, els espermatozoides van ser fixats en paraformaldehid al 4 % en PBS, pH 7,4 durant una hora en agitació a temperatura ambient. Posteriorment es van realitzar dos rentats per centrifugació amb PBS/BSA 1 % i van ser permeabilitzats amb una solució 0,1 % Triton X-100 en 0,1 % de citrat de sodi durant dos minuts en gel. Les mostres van tornar a rentar-se i van ser repartides en tres alíquotes: *a*) alíquota que es continua processant pel mètode del TUNEL, *b*) alíquota resuspesa en 300 µl d'etanol al 70 % i conservada a 4° C per la seva posterior anàlisi a la setmana vinent, *c*) alíquota resuspesa en 300 µl d'etanol al 70 % i conservada a -20° C per a la seva anàlisi posterior la setmana vinent prèvia descongelació i rentada amb PBS/BSA 1 %.

Totes les mostres i el control positiu van ser incubats durant una hora a 37° C i en obscuritat amb 50 µl de solució de marcatge (es va realitzar un control negatiu sense l'enzim TdT) seguint les instruccions del *kit* comercial (In Situ Death Detection Kit AP (TUNEL kit; Roche Diagnostic Corp. Indianapolis, IN, EUA). Després del marcatge es van realitzar dos rentats i els espermatozoides van ser resuspesos en 500 µl de PBS per a la seva anàlisi posterior per microscòpia òptica i citometria de flux.

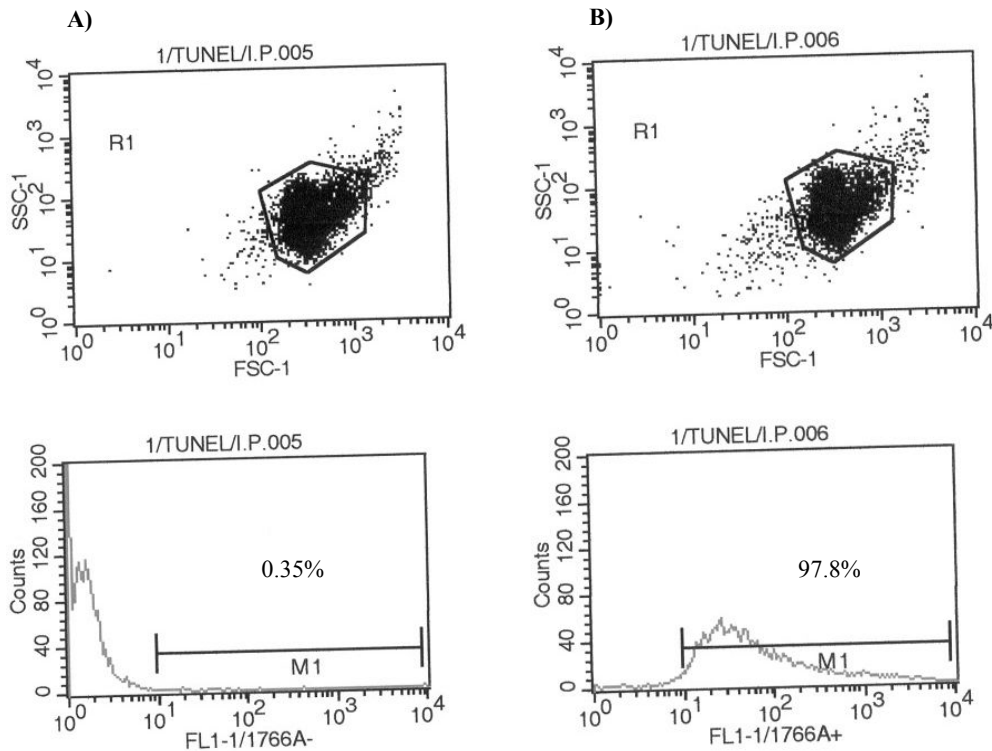


Figura 1 Representació gràfica per citometria de flux del percentatge d'espermatozoides TUNEL positius: a) control negatiu i b) control positiu.

Citometria de flux i microscòpia de fluorescència

La determinació del percentatge d'espermatozoides TUNEL positius per microscòpia òptica va ser realitzada per dos observadors, i posteriorment es va fer la mitjana. Es van comptar un mínim de dos-cents espermatozoides en contrast de fase i es va observar quin percentatge presentaven fluorescència verda forta al filtre *wide interference blue* (WIB).

Per a l'avaluació per citometria de flux es van acumular un mínim de deu mil esdeveniments per a cada mesura al citòmetre de flux (FACS Calibur; Becton Dickinson) amb un flux d'aproximadament dos-cents esdeveniments. Les dades van ser processades amb el programari analític CELLQUEST (Becton Dickinson).

RESULTATS

A la figura 1 es poden observar els resultats dels controls positiu i negatiu per a la tècnica de TUNEL per citometria de flux seleccionant la població a avaluar per forma i mida (SSC/FSC). El control positiu (figura 1b) va ser tractat amb DNAsa I. La figura 2 presenta els resultats de dues mostres de semen; una amb baixa po-

sitivitat de espermatozoides TUNEL positiu (figura 2a) i l'altra amb un percentatge elevat (figura 2b). A més, es mostren els resultats d'espermatozoides TUNEL positiu quan en la població a estudiar se seleccionen segons forma i mida o per espermatozoides marcats amb iodur de propidi posterior a la permeabilització (figura 2a: 11,5 % vs. 9,03 % i figura 2b: 39,92 % vs. 32,42 %).

Quant a l'efecte sobre el percentatge d'espermatozoides TUNEL positiu, després del procés de refrigeració a 4° C i congelació a -20° C posterior a la permeabilització amb etanol al 70 % es va observar que ambdós processos augmentaren de forma important la fragmentació del DNA, com es pot observar a la figura 3, en relació amb la mostra avaluada el mateix dia (figura 2b).

Es va observar una correlació positiva entre els valors d'espermatozoides TUNEL positiu en ser avaluats per microscòpia de fluorescència i per citometria de flux (no mostrat). No obstant això, utilitzant microscòpia de fluorescència en tots els casos el percentatge d'espermatozoides TUNEL positiu va ser inferior en comparació amb l'observat per citometria de flux.

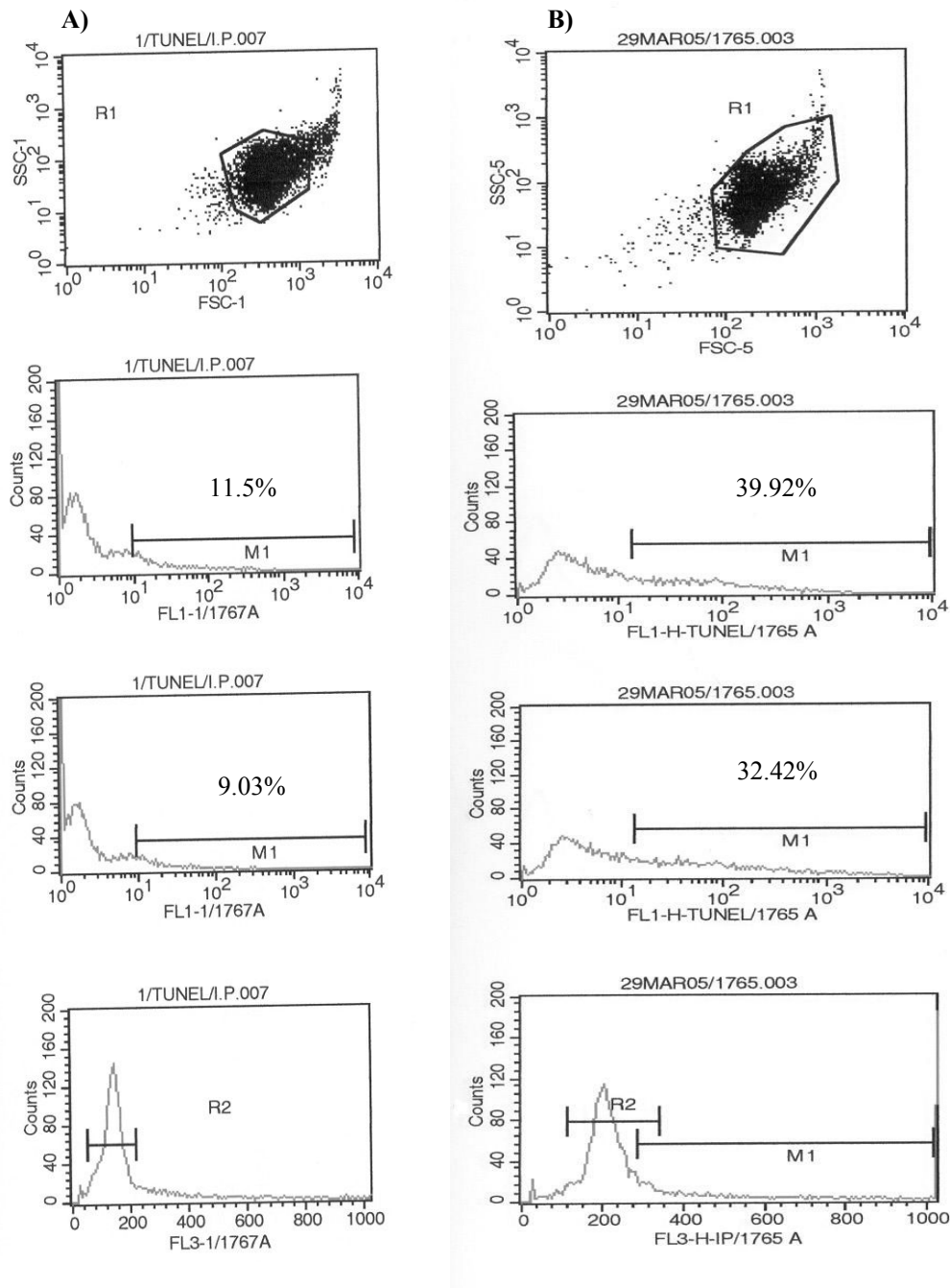


Figura 2 a) Mostra de semen amb un percentatge baix de fragmentació del DNA. b) Mostra de semen amb un percentatge elevat de fragmentació del DNA.

DISCUSSIÓ

Resultats previs demostren que els espermatozoides amb dany al DNA seleccionats per a ICSI podrien impedir el procés normal de descondensació, i donarien lloc a una fertilització errònia. Lopes *et al.* (1998) van observar que els varons amb una població espermàtica amb trencaments al DNA > 25 % tenien una taxa de fertilització < 20 % després de la ICSI. A més, aquests tenen un percentatge més petit d'embrions que

evolucionen a blastòcits quan són comparats amb els pacients que segueixen un tractament per FIV. (Shoukir *et al.*, 1998). Alguns autors han proposat que la tècnica TUNEL podria ser un assaig per a mesurar la qualitat biològica del semen (Oosterhuis *et al.*, 2000) Per aquests motius, queda clara la importància de desenvolupar un mètode estandaritzat per a mesurar els trencaments en el DNA dels espermatozoides dels pacients com a tècnica de rutina en qualsevol clínica de reproducció assistida.

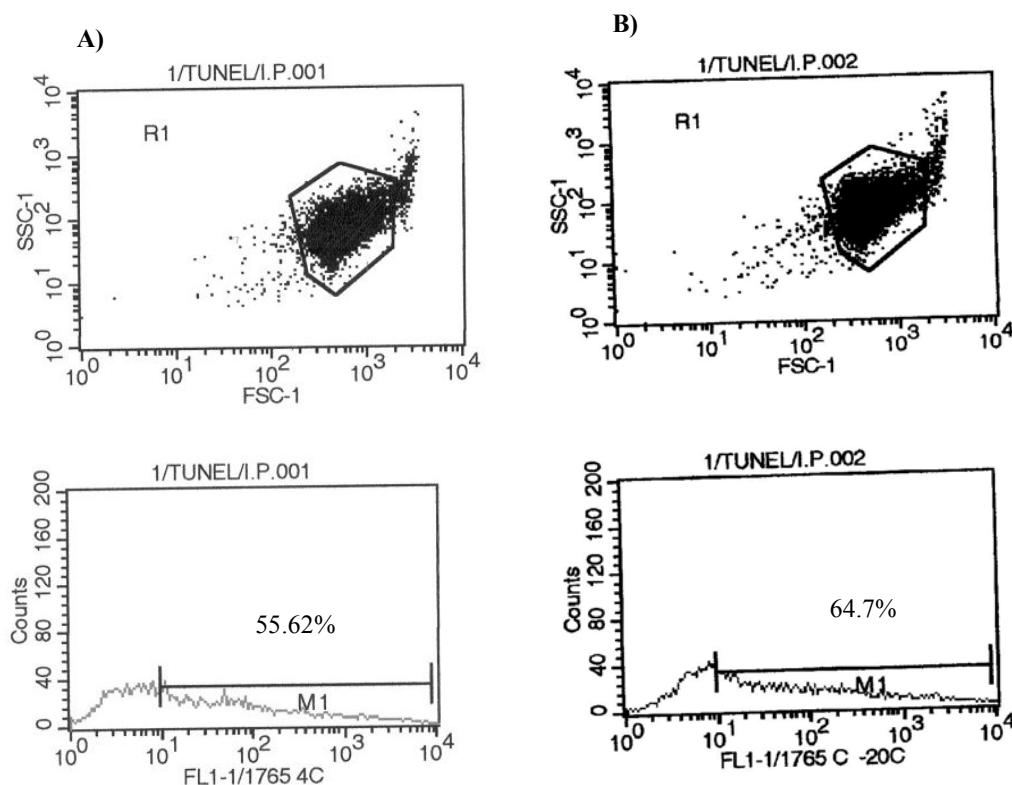


Figura 3 a) Espermatozoides TUNEL positiu posteriors a la conservació de la mostra a 4° C. b) Espermatozoides TUNEL positiu posteriors a la conservació de la mostra a -20° C.

D'altra banda, s'ha demostrat que les tècniques de selecció espermàtica per gradient contribueixen a disminuir el nombre d'espermatozoides amb DNA fragmentat (Ramos i Wetzels, 2001; Donnelly *et al.*, 2000; Weng *et al.*, 2002), i això indica que a més hauria d'estandarditzar-se sobre quina població espermàtica seria convenient realitzar l'estudi.

Es va observar que existeix una correlació positiva entre la determinació d'espermatozoides TUNEL positiu per microscòpia de fluorescència i citometria de flux, similar al que s'ha descrit (Muratori *et al.*, 2000). No obstant això, en aquesta última tècnica els valors de positivitat són majors que els de la primera, cosa que podria dificultar la comparació de resultats entre laboratoris que utilitzen un dels dos mètodes com a tècnica d'elecció.

Pel que fa a la utilització de la citometria de flux, la selecció de la població espermàtica, per forma i mida o per incorporació de IP un cop permeabilitzats, podria provocar variacions en els resultats entre laboratoris, factor que hauria d'estudiar-se en major profunditat per a arribar a resultats conclouents.

Una forma de facilitar la feina d'aquells laboratoris que utilitzin TUNEL seria poder reunir les mostres dels pacients i guardar-les en fred o congelades per a poder analitzar-les posteriorment d'un cop. En canvi,

els nostres resultats demostren que tant la conservació a 4° C com a -20° C en etanol al 70 % provoquen augments considerables en la fragmentació del DNA de les mostres. Seria convenient repetir aquest mateix estudi amb un nombre major de mostres per a poder confirmar aquest resultat i provar també aquest mateix efecte en mostres congelades en nitrogen líquid (Duru *et al.*, 2001)

Els resultats d'aquest treball demostren la necessitat d'estandarditzar la tècnica TUNEL en espermatozoides si en un futur es volgués implementar com a part de les anàlisis de rutina dins dels laboratoris de reproducció assistida.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb projecte de recerca de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional de I+D) BMC2003-03937) i Fondo de Investigaciones Sanitarias (V-2003-RED CO7A-0) a R. O. D. D. està subvencionat amb una beca de l'IDIBAPS.

BIBLIOGRAFIA

- BALHORN, R.; REED, S.; TANPHAICHITR, N. (1988). «Aberant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males». *Experientia*, 44:52-55.
- DE YEBRA, L. L.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; BASSAS, L. L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268:10553-10557.
- DONNELLY, E. T.; O'CONNELL, M.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. (2000). «Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa». *Hum. Reprod.*, 15:1552-1561.
- DURU, N. K.; MORSHEDI, M. S.; SCHUFFNER, A.; OEHNINGER, S. (2001) «Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation». *J. Androl.*, 22:646-651.
- FRAGA, C. G.; MOTCHNIK, P. A.; WYROBEK, A. J.; REMPEL, D. M.; AMES, B. N. (1996). «Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA». *Mutat. Res.*, 351:199-203.
- JI, B. T.; SHU, X. O.; LINET, M. S.; ZHENG, W.; WACHOLDER, S.; GAO, Y. T.; YING, D. M.; JIN, F. (1997). «Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers». *J. Natl. Cancer Inst.*, 89(3):238-244.
- LOPES, S.; SUN, J. G.; JURISCOVA, A.; MERIANO, J.; CASPER, R. F. (1998). «Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality sperm samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection». *Fertility and Sterility*, 69:528-532.
- MEZQUITA, C. (1985). «Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis». *Revis. Biol. Celular*, 5(V-XIV):1-124. Review.
- MURATORI, M.; PIOMBONI, P.; BALDI, E.; FILIMBERTI, E.; PECCHIOLI, P.; MORETTI, E.; GAMBERA, L.; BACCETTI, B.; BIAGIOTTI, R.; FORTI, G.; MAGGI, M. (2000). «Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm». *J. Androl.*, 21:903-912.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prot. nucleic. Acid Res. Mol. Biol.*, 40:25-94.
- OOSTERHUIS, G. J.; MULDER, A. B.; KALSBECK-BATENBURG, E.; LAMBALK, C. B.; SCHOEMAKER, J.; VERMES, I. (2000). «Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality?» *Fertil. Steril.* 74:245-250.
- RAMOS, L.; WETZELS, A. M. (2001). «Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay». *Hum. Reprod.*, 16:1703-1707.
- ROCA, J.; MEZQUITA, C. (1989). «DNA topoisomerase II activity in nonreplicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids». *EMBO J.*, 8(6):1855-1860.
- SHOUKIR, Y.; CHARDONNENS, D.; CAMPANA, A.; SAKKAS, D. (1998). «Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence?» *Human Reproduction*, 13:1632-1637.
- SORAHAN, T.; LANCASHIRE, R. J.; HULTEN, M. A.; PECK, I.; STEWART, A. M. (1997). «Childhood cancer and parental use of tobacco: deaths from 1953 to 1955». *Br. J. Cancer*, 75:134-138.
- WENG, S. L.; TAYLOR, S. L.; MORSHEDI, M.; SCHUFFNER, A.; DURAN, E. H.; BEEBE, S.; OEHNINGER, S. (2002). «Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm». *Mol. Hum. Reprod.*, 8:984-991.