

Relación entre los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático

Mónica Dorado Silva^a, Beatriz Migueles^a, Mercedes González^a, María Hebles^b, Laura Aguilera^a, Pascual Sánchez^b, Fernando Sánchez^b, Amelia Rodríguez^b, José Antonio Lara^b, Miguel Meyer^b y Natalio Cruz^b

^aFundación Guadalquivir de Investigación Médica. Sevilla. España.

^bClínica Ginemed. Sevilla., España.

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de nuestro estudio es evaluar la fragmentación del ADN de los pacientes que consultan por esterilidad en nuestras clínicas y de donantes voluntarios, y observar si hay correspondencia con las diferentes alteraciones seminales.

Método: Se ha analizado la fragmentación de 212 muestras seminales de pacientes que iban a ser sometidos a ciclos de fecundación in vitro, comparando las distintas alteraciones de concentración, movilidad y morfología de forma individual y sus combinaciones.

Resultados: Los pacientes que presentaban una única alteración, tanto los que mostraban la concentración como la movilidad disminuida tenían el ADN fragmentado en más del 50% de los casos. En los casos en los que mostraban alterada sólo la morfología sólo el 11% presentaba fragmentación.

Discusión: Los datos presentados en este estudio prueban una clara relación entre la calidad seminal y la fragmentación del ADN espermático con relación a la concentración y movilidad. En cambio no encontramos una relación muy alta entre el daño del ADN y la morfología espermática.

Conclusión: Consideramos que es importante realizar esta prueba complementaria a todos los pacientes con algún parámetro alterado para así saber qué protocolo seguiremos si se somete a un ciclo de reproducción, aumentando de esta forma las expectativas de embarazo.

Palabras clave: Fragmentación de ADN espermático. Calidad seminal. SCD (*sperm chromatin dispersion*). Esterilidad masculina.

ABSTRACT

Association between seminal parameters and sperm DNA fragmentation

Objective: The objective of our study was to evaluate the DNA fragmentation in patients who consult for infertility and voluntary donors, and see if there is any correspondence between the various seminal parameters and DNA damage.

Method: We analyzed the DNA fragmentation of 212 seminal samples from patients who were subjected to in vitro fertilization cycles, comparing the various alterations concentration, motility and morphology of individual and their combinations.

Results: More than 50% of patients who had a single alteration as concentration and motility showed fragmented DNA. In cases showing only altered morphology only 11% showed fragmentation.

Discussion: The data presented in this study prove a clear link between the seminal quality and sperm DNA fragmentation in relation to the concentration and mobility. On the other hand we did not find a relationship between high DNA damage and sperm morphology.

Conclusion: We consider important to make this additional test to all patients with any parameters altered to select the best protocol in a reproductive cycle.

Key words: Sperm DNA fragmentation. Seminal parameters. SCD (*sperm chromatin dispersion*). Male infertility.

INTRODUCCIÓN

Una de las causas más comunes de esterilidad en cualquier pareja con fallos reproductivos es la pobre calidad seminal¹. Sin entrar en el debate de su prevalencia resulta obvio que en el estudio básico del varón se

Correspondencia: Dra. M. Dorado Silva
 Farmacéutico Murillo Herrera, 3.
 41010 Sevilla. España.
 Correo electrónico: mdorado@ginemed.es

debe solicitar un seminograma, en el que se analizarán parámetros como concentración, movilidad y morfología, principalmente. Con los avances en técnicas de reproducción asistida se hace necesario profundizar más en el estudio seminal, porque queda patente que el seminograma básico no es suficiente para evaluar con precisión la calidad del espermatozoide.

Con la introducción de la ICSI (inyección espermática intracelular) se observó una tendencia a minimizar la importancia de los parámetros seminales basándose en unos resultados aparentemente independientes de la calidad del semen empleado. “Cualquier semen puede ser válido para ICSI si hay al menos unos pocos espermatozoides en él” se decía. Sin embargo, el paso del tiempo ha devuelto protagonismo al estudio del varón, el llamado “factor masculino”. Ya con el incremento de experiencia en ICSI, se hizo evidente que hay paciente cuyos espermatozoides muestran fallos repetidos para formar embriones viables, independientemente de que sean capaces de fecundar al óvulo².

La fertilización involucra la interacción directa del espermatozoide y el óvulo, la fusión de las membranas celulares y la unión de los genomas. La complejidad de este proceso y el desarrollo posterior del embrión dependen, en parte, de la integridad del ADN espermático. Parece que el daño del ADN, es decir, el anormal empaquetamiento o la deficiencia de protaminas en él, resulta clave para el desarrollo embrionario y es un factor limitante en la tasa de embarazo³. Un mal empaquetamiento de ADN espermático parece correlacionarse con un efecto paterno tardío, provocando fallos de implantación o pérdidas tempranas de embarazos^{4,5}.

Por otro lado, una característica del semen de varones infértiles, principalmente con oligoastenozoospermia, es la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés: *reactive oxygen species*)⁶. Una consecuencia de esas especies es el daño que se produce en la membrana plasmática del espermatozoide, que conlleva un descenso en el porcentaje de embarazos, tanto in vivo como in vitro^{7,9}. Las ROS no sólo dañan los lípidos de las membranas plasmáticas de los espermatozoides sino también a otras estructuras, particularmente el ADN¹⁰⁻¹³. Aunque no está demostrado que el daño en el ADN del espermatozoide se relacione con un fallo de fertilización, no se puede descartar la transmisión de esa alteración al embrión⁶.

El ácido ascórbico protege al ADN espermático del daño provocado por el estrés oxidativo exógeno. Según los estudios de Gyun et al, hay una correlación entre los valores de este ácido en el plasma seminal y el porcentaje de ADN desnaturalizado en el espermatozoide (DFI, del inglés: *DNA fragmentation index*), los pacientes con un DFI alterado presentan un défi-

cit. Estos pacientes con bajos valores de ácido ascórbico también presentan los parámetros seminales convencionales alterados¹⁴.

El objetivo de nuestro estudio es evaluar la fragmentación del ADN de los pacientes que consultan por esterilidad y de los donantes voluntarios, y tratar de evidenciar alguna relación con los diferentes patrones de alteraciones seminales.

MÉTODO

El estudio se ha llevado a cabo analizando 212 muestras seminales de pacientes que iban a ser sometidos a ciclos de reproducción asistida 2 meses antes de la iniciación. Las muestras normozoospermicas se obtuvieron de donantes voluntarios. En todos los casos se guardó una abstinencia de 3 a 5 días, las muestras se obtuvieron por masturbación en recipiente estéril y analizadas en menos de 1 h desde su obtención.

Las muestras se dejaron 20 min que licuaran a 30 °C, a continuación se realizó el análisis de la concentración ($\times 10^6$ /ml) y movilidad (en %) en una cámara Makler con un volumen de 5 μ l.

La morfología se estudió sobre una extensión de 5 μ l de semen fresco teñido con diff quik. Las formas normales se consideran las que tienen un acrosoma bien definido que ocupa del 40-70% de la cabeza, no tienen defectos de cuello, pieza intermedia o cola y las medidas de la cabeza son 5-6 μ m de largo y entre 2,5-3,5 μ m de diámetro.

Preparación de las muestras seminales

El análisis de la fragmentación se llevó a cabo en muestras sin capacitar por el SCD (*sperm chromatin dispersion*) (halosperm) según el manual.

Determinación de fragmentación

La tinción se realizó con diff quik y el conteo se llevó a cabo en un microscopio óptico con objetivo de 100 \times bajo aceite de inmersión. En cada muestra se contabilizó un total de 500 espermatozoides, separados en:

- Espermatozoides con halo grande: espermatozoides cuyo grosor del halo es igual o mayor a la longitud del diámetro menor del core.
- Espermatozoides con halo mediano: el grosor del halo está comprendido entre mayor que un tercio del diámetro menor del core y menor que el diámetro menor del core.
- Espermatozoides con halo pequeño: el grosor del halo es igual o menor que un tercio del diámetro me-

nor del core, pudiendo ser de forma irregular o prácticamente inapreciable.

- Espermatozoides sin halo.
- Espermatozoides sin halo y degradados: los que sin mostrar halo presentan el core fragmentado en gránulos o muestran una tinción muy débil.

Los espermatozoides con halo grande o mediano se consideraron normales, siendo el resto los que presentaron fragmentación.

RESULTADOS

El semen de los 212 pacientes se clasificó según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud en oligozoospermia ($< 20 \times 10^6/\text{ml}$), astenozoospermia ($< 50\%$ de movilidad a+b), teratozoospermia ($< 15\%$ de formas normales) y sus combinaciones. La fragmentación del ADN se consideró patológica cuando se obtenía más del 30% de espermatozoides fragmentados. En la tabla 1 se reflejan los valores seminales y el porcentaje de fragmentación obtenido.

En nuestro estudio se ha separado a los pacientes en varios grupos en función de la alteración o alteraciones que presentaban en el seminograma. De los pacientes que presentaban una única alteración, tanto los que mostraban la concentración como la movilidad disminuida, más del 50% de los casos tenía el ADN fragmentado. En los casos en los que mostraban sólo alterada la morfología, únicamente el 11% presentaba fragmentación. Cuando se combinan varios parámetros alterados la fragmentación aparece en alrededor del 50% de los casos, siendo superior en los pacientes oligoastenosis y oligoastenoteratozoospermicos. El grupo control presentó fragmentación sólo en el 2% de los casos.

DISCUSIÓN

Los datos presentados en este estudio prueban una clara relación entre la calidad seminal y la fragmentación

del ADN espermático. Se observa que muestras con una concentración y movilidad disminuidas presentan una fragmentación aumentada. Hecho que se hace más patente cuando se combinan varios parámetros y cuando lo comparamos con muestras normozoospermicas.

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre el daño del ADN y la morfología espermática. En un estudio previo en el que se compararon las tasas de fecundación y embarazo en ciclos de ICSI en función de la morfología espermática, tampoco se encontró relación alguna¹⁵. Las tasas de embarazo no se modificaban en función de la morfología y los resultados comparados resultaron similares. Estos resultados son apoyados por los de Tomlinson et al¹⁶, que tampoco encontraron asociación entre el daño del ADN y la morfología espermática.

Nuestros hallazgos de correlación negativa entre el daño del ADN y la calidad seminal se ven apoyados por otros laboratorios. Así lo comunicaron con anterioridad, por ejemplo, Irvine et al⁶ y Sun et al¹⁷. Sin embargo Hughes et al¹⁸, que examinaron el ADN de pacientes donantes y los que presentaban astenozoospermia, no encontraron diferencias significativas.

A diferencia de las células somáticas, en el núcleo de los espermatozoides se encuentra únicamente el ADN fuertemente empaquetado y predominantemente con proteínas básicas. Durante los estados tardíos de la espermatogénesis, los núcleos de las espermátides son remodelados y condensados, pasando a estar asociados a protaminas en lugar de a histonas. Las cadenas de ADN se asocian íntimamente a las protaminas formando lazos con uniones disulfuros responsables de la compactación y estabilización del núcleo espermático. Esta compactación es importante para proteger al genoma espermático de los agentes externos de estrés, como la oxidación o la elevación de la temperatura. Los varones infértiles tienen, comparado con el grupo control, un aumento de histonas con respecto a las protaminas (ratio histona/protamina)³.

Por otro lado, se estima que la apoptosis destruye aproximadamente el 75% de los espermatozoides en potencia. La apoptosis selectiva evita la formación de espermatozoides anormales. Sakkas et al¹⁹ sugieren que hay espermatozoides con ADN dañado que han escapado de esa apoptosis controlada, ya sea por la edad de los pacientes, la presencia de gonadotoxinas u otros tóxicos sistémicos como ciertas terapias anti-neoplásicas.

Ante una pareja en reproducción, en la que se encuentra una elevada tasa de fragmentación del ADN en el espermatozoide del varón, hay una serie de parámetros que hay que tener en cuenta, como son el número de ciclos previos fallidos, la edad materna y la

TABLA 1. Parámetros seminales y fragmentación

	DFI \geq 30%
Oligozoospermia	60
Astenozoospermia	52
Teratozoospermia	11
Oligoastenozoospermia	62
Oligoteratozoospermia	48
Astenoteratozoospermia	47
Oligoastenoteratozoospermia	65
Normozoospermia	2

DFI: ADN desnaturalizado en el espermatozoide (*DNA fragmentation index*).

asociación a otras patologías como puede ser un estudio de meiosis alterado².

Aunque se han sugerido diferentes pautas de actuación para el manejo de estos pacientes, entre las más aceptadas estarían el tratamiento con antioxidantes²⁰, el empleo de alta magnificación para evitar microinyectar utilizando espermatozoides con vacuolas²¹ y utilizar espermatozoides directamente del testículo²².

CONCLUSIONES

Aunque la proporción de pacientes con alteraciones seminales y fragmentación elevada es bastante significativa, se considera que es importante realizar esta prueba complementaria a todos los pacientes con algún parámetro alterado, para saber así qué protocolo hay que seguir si se somete a un ciclo de reproducción y aumentar las expectativas de embarazo. La fragmentación del ADN espermático se está revelando útil en la toma de decisiones en nuestra práctica diaria. Los resultados de nuestra serie evidencian una baja tasa de fragmentación de ADN espermático en pacientes con teratozoospermia pura. Parece evidente que futuros estudios van a ir dando mayor protagonismo en el futuro inmediato a este test, permitiendo trasladar a la práctica clínica andrológica pautas apoyadas en evidencias cada vez más sólidas.

Bibliografía

- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sacas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for conception. *Hum Reprod.* 2001;16:2160-5.
- Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reproductive Biomedicine Online.* 2006;12:715-21.
- Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ.* 2006;175:495-500.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2004;19:611-5.
- Tesarik J. The paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reproductive Biomedicine Online.* 2005;10:370-5.
- Irvine DS, Twigg J P, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2002;21:33-44.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FCW. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl.* 1989;10:214-20.
- Aitken RJ, Irvine DS, Wu FCW. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164:542-51.
- Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ. Prediction of the in-vitro fertilization potential of human spermatozoa using sperm function-tests- the effect of the delay between testing and IVF. *Hum Reprod.* 1996;11:1030-4.
- Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res.* 1992;275:331-42.
- Altman SA, Zastawny TH, RandersEichorn L, Cacciuto MA, Akman SA, Dizdaroglu M, et al. Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Rad Biol Med.* 1995;19:897-902.
- Palomba L, Brambilla L, Brandi G, Sestili P, Cattabeni F, Canton O. Low levels of hydrogen peroxide and L-histidine induce DNA doublestrand breakage and apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 1996;318:167-73.
- Loyd DR, Phillips DH, Carmichael PL. Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack. *Chem Res Toxicol.* 1997;10:393-400.
- Song GJ, Norkus EP, Lewis V. Relations between seminal ascorbic and sperm DNA integrity in infertile men. *Int J Androl.* 2006;29:569-75.
- Dorado M, Migueles B, Hebles M, González M, Sánchez P, Sánchez F. Tasas de fecundación y de embarazo en ciclos de ICSI en función de la morfología espermática. *Rev Iberoamericana de Infertilidad.* 2007;24:21-4.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sacas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod.* 2001;16:2160-5.
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in Vitro. *Biol Reprod.* 1997;56:602-7.
- Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Reprod Dev.* 1996;2:613-9.
- Sakkas D, Seli E, Bizzarro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2003;7:428-32.
- Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi M, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod.* 2005;20:2590-4.
- Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High magnification ICSI overcomes paternal affect resistant to convencional ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2006;12:19-25.
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005;20:226-30.