

Fragmentación del ADN espermático

Reproducción 2017;32:38-42

Integrantes de la mesa

Gastón Rey Valzacchi (Coordinador)

Florencia Fulco (Secretaria)

Jorge Blaquier

José María Montes (Uruguay)

Mercedes Norma Pugliese

Mariano Cohen

Vanesa Rawe

Sergio Aszpiz

Conrado Avendaño

Definición

La fragmentación del ADN espermático se refiere a la ruptura en cadena simple o doble de la estructura del ADN en el núcleo espermático. Numerosos autores han descrito que existe una relación negativa entre las alteraciones en la organización y estructura del ADN del núcleo espermático y el potencial fecundante de los espermatozoides.^{1,2}

El impacto que tiene el daño del ADN dependerá del tipo de daño (cadenas simples o dobles), de la región del genoma afectado (intrones o exones) y de la habilidad del ovocito para repararlo antes de iniciar la primera división mitótica.³

El tema es particularmente relevante en la era de la reproducción asistida de alta complejidad en la que, frecuentemente, se saltea la barrera de la selección natural generando justificada preocupación en lo referente a la seguridad de utilizar espermatozoides con daño en su ADN.⁴

Mecanismo de fragmentación del ADN espermático.

Existen numerosos factores tanto intrínsecos o inherentes al desarrollo espermático, como extrínsecos o derivados de exposiciones, que favorecen la aparición de daño sobre el ADN espermático, que se pueden resumir en los siguientes mecanismos:

- *Factores intrínsecos:* 1) Compactación incompleta de la cromatina: ligada a una disminución de la protaminación. Esta situación generaría un estado de susceptibilidad de la cromatina al ataque de agentes endógenos y exógenos como nucleasas o múgatenos.⁵ 2) Defectos en el remodelado de la cromatina durante la espermatogénesis por defectos en procesos fisiológicos de reparación de rupturas.⁶ 3) Asociado a defectos en los mecanismos de apoptosis espermática.⁷ Y 4) estrés oxidativo producto de la alteración del equilibrio entre las especies reactivas del oxígeno generadas fisiológicamente y los antioxidantes fisiológicos del ambiente.⁸

- *Factores extrínsecos:* 1) Radiación y quimioterapia. Los individuos expuestos a sustancias mutagénicas, radiactivas y/o teratogénicas son potencialmente vulnerables de sufrir fragmentación en el ADN espermático.⁹ 2) Exposición ambiental a fuentes de calor, traumas, infecciones, pesticidas, agroquímicos, etc.

Impacto de la fragmentación de ADN espermático en el proceso reproductivo

El espermatozoide con ADN fragmentado es capaz de fertilizar al ovocito y se ha demostrado que puede haber mayor daño del ADN espermático en hombres infértiles que en varones fértiles.¹⁰

Existe suficiente evidencia científica que demuestra que los niveles elevados de fragmentación de ADN espermático repercutirán en el desarrollo embrionario.^{11,12} Además, se ha visto en animales de experimentación, que la utilización de espermatozoides con ADN fragmentado puede generar efectos en la vida adulta, como el crecimiento aberrante, envejecimiento prematuro, alteraciones del comportamiento y tumores mesenquimales.⁴

La fragmentación elevada del ADN espermático se asocia con bajas tasas de embarazo espontáneo o aumento de abortos recurrentes en concepciones espontáneas.^{13,14}

En tratamientos de reproducción asistida también se demostró que produce alta tasa de fracasos, así como un aumento de los abortos. Esto ha sido demostrado tanto para la inseminación intrauterina (IIU)¹⁵ como para la fertilización in vitro (FIV)^{1, 16-18} e inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).^{19, 20} De esto surge la importancia de estudiar y seleccionar los gametos, previo a un tratamiento de reproducción asistida.

En base a estos conceptos, el grupo considera que la evaluación de la fragmentación del ADN espermático es una herramienta que debe ser considerada en la práctica clínica.

Métodos para la evaluación de la fragmentación del ADN

Durante las últimas dos décadas una serie de pruebas se han introducido para el análisis de la fragmentación del ADN espermático. Estas técnicas podrían agruparse en: 1) pruebas directas en las que se mide el daño del ADN sin un tratamiento previo (TUNEL y ensayo de cometa con un pH neutro) y 2) las pruebas indirectas que miden el daño del ADN después de la desnaturalización: SCSA y SCD.

Las técnicas de mayor uso clínico en la actualidad son:

SCSA: Mide la susceptibilidad del ADN espermático a desnaturalizarse *in situ* inducido por calor o ácido, seguido por la tinción con naranja de acridina.²¹ La detección se realiza por citometría de flujo que permite medir una gran cantidad de espermatozoides por muestra, lo que la hace altamente reproducible.²² El naranja de acridina es un marcador metacromático que fluoresce rojo cuando se une con el ADN desnaturalizado (simple hebra) y verde cuando se une al ADN no desnaturalizado (doble hebra). El ADN de los espermatozoides con una estructura normal de la cromatina no se desnaturalizaría mientras que si las cadenas de ADN contienen roturas, pueden alcanzar diferentes grados de desnaturalización. El SCSA mide diferentes parámetros. El índice de fragmentación del ADN (DFI) que representa la fracción de espermatozoides con ADN de simple cadena. El ADN altamente teñido (HDS) detecta la fracción de espermatozoides con mayor accesibilidad a la tinción metacromática al ADN de doble cadena principalmente debido a

la sustitución de las histonas por protaminas. Algunos estudios han indicado que valores de DFI mayores a 27% están asociados con el fracaso del embarazo en tratamientos de reproducción asistida (TRA o ART, del inglés *assisted reproductive techniques*).^{23, 24}

SCD: El ensayo de dispersión de la cromatina espermática (SCD) se basa, al igual que el SCSA, en la susceptibilidad del ADN a descondensarse inducida por un medio ácido y la evaluación de la dispersión de ADN en halos de tamaño variable.²⁵ En el último tiempo se ha desarrollado una versión mejorada y estandarizada del protocolo de SCD conocido como *Halosperm*[®] (*Halotech DNA SL*, España), con mejor coloración de la cromatina y la preservación de la calidad de la cola.²⁶ Por ser una técnica nueva, su utilización no está aún muy difundida. Sin embargo, recientemente se ha demostrado su valor en la predicción de la tasa de fertilización, la calidad del embrión y la tasa de implantación en 85 parejas participantes en un programa de FIV/ICSI.²⁷

Ensayo de cometa: La electroforesis de una sola célula en un microgel o el ensayo de cometa fue desarrollada para evaluar la integridad del ADN, incluyendo dobles y simples roturas en células somáticas.²⁸ El tratamiento del ADN en condiciones de pH neutro permite la detección de rupturas de cadenas simples de ADN. En este ensayo, el ADN dañado migra en el gel de agarosa y dependiendo de la cantidad de fragmentos de ADN, se creará una cola (similar a un cometa) más grande o más chica, que se visualiza por medio de tinciones específicas para el ADN, mientras que si el ADN está intacto y súper enrollado, no se formará el “cometa”.

TUNEL: El ensayo de TUNEL ha sido extensamente usado para la evaluación directa de la fragmentación de ADN espermático. Esta técnica se basa en la adición de nucleótidos marcados en la porción 3'-OH del ADN dañado o fragmentado por medio de una reacción catalizada por la enzima deoxinucleotidasa terminal transferasa.²⁹ La proporción de ADN dañado puede ser medida tanto por microscopía como por citometría de flujo. El ensayo de TUNEL puede detectar tanto el daño de hebra simple como doble. Es importante señalar que aunque la prueba de TUNEL se utiliza con frecuencia para la determinación de la apoptosis

celular, un resultado de TUNEL positivo no es sinónimo de apoptosis, como es el caso del daño del ADN inducido por radiaciones ionizantes o por radical hidroxilo.³⁰ El concepto de que la evaluación del ADN en espermatozoides es asociado a apoptosis es una gran sobreestimación de la capacidad de la prueba. El ensayo de TUNEL tiene baja variabilidad tanto intra como inter observador.³¹ Debido a su alta especificidad y reproducibilidad, este ensayo es uno de los más frecuentemente usados para evaluar la fragmentación de ADN espermático. Su relación con la función espermática como con la fertilización o embarazo ha sido demostrada por diferentes autores.^{18, 32, 33}

Las publicaciones y la práctica clínica muestran una gran variabilidad entre los métodos, intra e interensayo, lo cual dificulta establecer los valores de corte. Por dicha razón este grupo considera de suma importancia realizar esfuerzos para estandarizar las metodologías existentes.

El grupo propone de preferencia la utilización de métodos directos sobre muestras con posterioridad a la selección espermática (swim up, gradientes). Asimismo, considerar el tiempo de abstinencia sexual previa a la obtención de la muestra evitando períodos mayores a 5 días.

Indicaciones del estudio

Si bien la bibliografía es controvertida en cuanto a las indicaciones del estudio, el grupo considera como posibles indicaciones:

- Aborto recurrente.
- Falla implantatoria.
- Edad del varón (> a 45 años).
- Causas de posible incremento del estrés oxidativo (varicocele, tabaquismo, leucocitospermia, infección seminal, exposición a tóxicos, etc).
- Antecedentes de exposición a radio o quimioterapia.
- Infertilidad sin causa evidente.
- Paciente que ingresa en un procedimiento de reproducción asistida.
- Mala calidad embrionaria.
-

Tratamiento medicamentoso para la fragmentación del ADN

Se recomienda como medida inicial el estudio del paciente para identificar y realizar el trata-

miento de causas que inducen la fragmentación (por ejemplo corrección quirúrgica del varicocele, evitar tóxicos, etc). Asimismo, se aconseja períodos cortos de abstinencia sexual, sea de 24 - 48 hs en el momento periovulatorio o previo al procedimiento de reproducción asistida.

Se han propuesto muchos productos nutracéuticos para incrementar la fertilidad del varón, los cuales se han popularizado debido principalmente al fácil acceso, a la baja incidencia de efectos adversos y a los relativos bajos costos, cuando se los compara con los tratamientos de reproducción asistida.³⁴

La terapia medicamentosa que se propone es en base a moléculas que actúan como antioxidantes, bajo el principio de que el estrés oxidativo daña las membranas y el material genético de las células, y que está dado por un incremento de las especies reactivas del oxígeno que los antioxidantes fisiológicos no alcanzan a compensar. Aunque hay controversias en la literatura sobre el valor real de la terapia medicamentosa en la infertilidad del varón,³⁵ es claro que:

- La mayoría de los trabajos reporta efectos beneficiosos de los antioxidantes orales sobre la fragmentación del ADN espermático.^{36, 37}

- Una proporción algo menor reporta aumento en las tasas de embarazo espontáneo y disminución en los abortos tempranos.^{38, 39}

- En general los trabajos sugieren la necesidad de medir especies reactivas del oxígeno en semen antes de iniciar el tratamiento, ya que su aumento sería la indicación precisa para el mismo.⁴⁰

- Pocos trabajos postulan la mejoría en los parámetros seminales (movilidad, morfología y recuento) por este tratamiento. Una excepción son algunos trabajos que reportan mejoría en la motilidad cuando analizan una población de pacientes astenozoospermicos puros.

- Los antioxidantes más utilizados son la Vitamina E y vitamina C, y aparentemente tienen la misma efectividad que otros preparados de costo mucho mayor (compuestos con L-carnitina, L-acetil carnitina y coenzima Q 10). Aunque las dosis no están estandarizadas, se recomiendan dosis de hasta 1.000 UI de vitamina E y 1 g de vitamina C diarios.^{36, 39}

En base a la experiencia general del grupo, se aconseja la terapia antioxidante oral fundamental-

mente con vitamina E 800 – 1.000 UI y vitamina C 1 gr por día por al menos 60 días y por no más de 6 meses, con control de la efectividad del tratamiento en tres meses.

Técnicas de separación para espermatozoides con fragmentación

Se han descripto distintas maneras de seleccionar espermatozoides con menos daño de ADN. Una manera de obtener espermatozoides con menor daño de ADN en un procedimiento de reproducción asistida consiste en solicitar poca abstinencia sexual (menos de 48 hs).⁴¹

La selección previa de espermatozoides por medio de las técnicas convencionales de *swim up* o gradiente de por sí disminuye los niveles de fragmentación.⁴²

Dentro de las técnicas de laboratorio posibles de selección de espermatozoides con menor fragmentación están el PICSI,⁴³ las columnas de anexina⁴⁴ y la selección por carga⁴⁵ (electroforesis, método Z). Si bien estas técnicas son efectivas en recuperar una población de espermatozoides con menor fragmentación, no existe a la fecha evidencia bibliográfica que sustente su beneficio clínico.⁴⁶ Algunos trabajos muestran una menor fragmentación del ADN de los espermatozoides testiculares, por lo cual en ciertas situaciones una estrategia posible sería la utilización de espermatozoides obtenidos por biopsia testicular.^{47, 48}

El grupo propone la utilización de estas técnicas con el objetivo de seleccionar los espermatozoides con menor fragmentación de ADN con el fin de minimizar su impacto negativo en el desarrollo embrionario.

Conclusiones

En relación a la fragmentación del ADN espermático, este grupo recomienda:

- Su evaluación en la práctica clínica en los casos previamente mencionados.
- La resolución de causas tratables.
- El uso de la terapia antioxidante oral.
- Las técnicas de selección espermática en el contexto de los tratamientos de reproducción asistida en los casos indicados.

Referencias

1. Sun J, Jurisicova A, Casper R. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602-607.
2. Spano M, Seli E, Bizzaro D, Manicardi G, Sakkas D. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17: 255-260.
3. Aitken R, De Iuliis G. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Hum Reprod* 2010; 16(1): 3-13.
4. Fernandez-Gonzalez, R, Moreira PN, Perez-Crespo M, Sanchez-Martin M, Ramirez MA, Pericuesta E, et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008; 748: 761-772.
5. Gharagozloo P, Aitken J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 2011; 26(7): 1628-1640.
6. Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. H2AX: The histone guardian of the genome. *DNA Repair* 2004; 3: 959-967.
7. Sakkas D, Alvarez J. Sperm DNA fragmentation: mechanism of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fert Ster* 2010; 93: 1027-1036.
8. Aitken R, Clarkson J, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41(1): 183-197.
9. Morris I. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002; 25(5): 255-261.
10. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 2006; 175(5): 495-500.
11. Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM. DNA Damage in Bovine Sperm Does Not Block Fertilization and Early Embryonic Development But Induces Apoptosis After the First Cleavages. *J Androl* 2006; 27: 176-188.
12. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 82: 378-383.
13. Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, et al. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod Jun* 2003; 18(6): 1265-1272.
14. 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 Jan* 2000; 73(1): 43-50.
15. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002; 17(12): 3122-3128.
16. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17(4): 990-998.
17. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, et al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81(4): 965-972.
18. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79(7): 559-563.

19. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fert Steril* 2014; 102(4): 998-1005.
20. Avendaño C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fert Steril* 2010; 94(2): 549-557.
21. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 2000; 22(2-3): 169-189.
22. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* Jan-Feb 2002; 23(1): 25-43.
23. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15(8): 1717-1722.
24. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003; 80(4): 895-902.
25. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24(1): 59-66.
26. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005; 84(4): 833-842.
27. Muriel L, Meseguer M, Fernandez JL, Alvarez J, Remohi J, Pellicer A, et al. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod* 2006; 21(3): 738-744.
28. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 30; 123(1): 291-298.
29. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; 207(1): 202-205.
30. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993; 49(5): 1083-1088.
31. 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(6): 1338-1344.
32. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, et al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81(4): 965-972.
33. Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* Aug 2000; 74(2): 245-250.
34. Ko EY, Sabanegh ES. The role of nutraceuticals in male infertility. *Urol Clin N Am* 2014; 41: 181-193.
35. Agarwal A, Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum Fertil* 2010; 13: 217-225.
36. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility (review). *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 12: CD007411.
37. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005; 26(3): 349-353.
38. Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, El-Toukhy T. A systematic review of the effect of oral antioxidants in male subfertility. *Reprod Biomed Online* 2010; 20: 711-723.
39. Tremellen K. Oxidative Stress and male infertility. A clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008, 14(3): 243-258.
40. Ko EY, Sabanegh ES Jr, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril* 2014; 102: 1518-1527.
41. Pons I, Cercas R, Villas C, Braña C, Fernández-Shaw S. One abstinence day decreases sperm DNA fragmentation in 90% of selected patients. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30: 1211-1218.
42. Wang WS, Shi JZ, Zhang SL, Zhao WQ, Shi WH, Guo BZ, Qin Z. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31(9): 1161-1166.
43. Parmegiani L, Cognigni GB, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. "Physiologic ICSI": Hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 2010; 93: 598-604.
44. Hoogendijk C, Kruger TF, Bouic PJD, Henkel RR. A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertil Steril* 2009; 91: 1285-1292.
45. Said TM, Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011, 17(6): 719-733.
46. McDowell S, Kroon B, Ford E, Hook Y, Glujovsky D, Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* Oct 2004; 28; 10: CD010461.
47. Moskovtsev SI, Alladin N, Lo KC, Jarvi K, Mullen JB, Librach CL. A comparison of ejaculated and testicular spermatozoa aneuploidy rates in patients with high sperm DNA damage. *Syst Biol Reprod Med* 2012; 58(3): 142-148.
48. Esteves SC, Sánchez-Martín F, Sánchez-Martín P, Schneider DT, Gosálvez J. Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Fertil Steril*. 2015. [Epub ahead of print].