

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

“Impacto de la fragmentación del ADN espermático  
en la población infértil”

Myriam Álvarez de la Fuente

Junio 2013



Yosu Franco Iriarte, Doctor en Biología por la Universidad de Navarra, Embriólogo de la Unidad de Reproducción Asistida del Centro Sanitario Virgen del Pilar.

**CERTIFICA:**

Que el trabajo presentado por D<sup>ña</sup>. MYRIAN ÁLVAREZ DE LA FUENTE, titulado "IMPACTO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN LA POBLACIÓN INFÉRTIL", realizado bajo la dirección del Dr. Yosu Franco Iriarte, dentro del programa de "Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción", reúne a su juicio las condiciones necesarias para ser admitido como trabajo fin de máster.

Y para que así conste dónde convenga, firma la presente certificación en Oviedo a 6 de Junio de 2013,

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>

Fdo: Yosu Franco Iriarte

## **AGRADECIEMIENTOS**

*En particular, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Yosú Franco Iriarte, director de este trabajo, por su incondicional apoyo, así como por su paciencia y dedicación. Gracias por haber estado siempre ahí, a pesar de la distancia, gracias por no haber puesto límites a la hora de enseñarme y por intentar siempre sacar lo mejor de mí.*

*Gracias a mi familia, a mis padres, a mi hermana y a mi cuñado, por confiar en mí desde el principio y estar siempre a mi lado.*

*A ti, porque mis logros son también los tuyos.*

*Por último, quiero agradecer a vosotras cuatro, porque habéis hecho de este año una aventura de princesas.*

*Y aunque todavía no estés aquí, a ti **Lucas**.*

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	4
	Etiología del daño espermático .....	6
	Detección de la fragmentación del ADN espermático.....	9
	Importancia clínica .....	13
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	14
III.	MATERIAL Y MÉTODO .....	15
IV.	RESULTADOS.....	19
V.	DISCUSIÓN .....	22
	Posibles alternativas para pacientes con muestras fragmentadas.....	23
VI.	CONCLUSIONES .....	27
	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS .....	28

**LISTADO DE SIGLAS**

ACOS	Anticonceptivos orales
CP	Corpúsculo polar
DAPI	4,6 diamidino-2-fenilindol
ETS	Enfermedad de transmisión sexual
FISH	Inmunofluorescencia in situ
FSH	Hormona foliculoestimulante
IA	Inseminación artificial
IAC	Inseminación artificial de conyugue
IAD	Inseminación artificial de donante
ICM	Masa celular interna
ICSI	Microinyección espermática
IDF	Índice de fragmentación
IMSI	Microinyección de espermatozoides seleccionados morfológicamente
IP	Ioduro de propidio
ISNT	In situ Nick translation
FIV	Fecundación in vitro
MACS	Selección celular inmunomagnética
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino
PS	Fosfatidil serina
PVP	Polivinil pirrolidona
REM	Recuento de espermatozoides móviles
ROS	Radicales libres de oxígeno

SCD	Test de dispersión de la cromatina
SCSA	Sperm chromatin structure assay
TE	Trofoectodermo
TESA	Aspiración testicular de espermatozoides
TESE	Extracción testicular de espermatozoides
TRA	Técnica de reproducción asistida
TUNEL	Terminal d-UTP Nick-end labeling
ZP	Zona pelúcida

## **I. INTRODUCCIÓN**

El uso de las técnicas de reproducción asistida, como tratamiento para la infertilidad humana, ha ido incrementándose en los últimos años. La infertilidad humana afecta a un 20% de las parejas en edad reproductiva siendo casi en la mitad de los casos, el factor masculino la causa principal. Además, el 25% de estos casos de infertilidad son de origen idiopático (Evenson et al., 1999).

La fragmentación del ADN espermático es una de las alteraciones que afecta al gameto masculino, estando íntimamente relacionado con defectos genéticos y epigenéticos. En estos últimos años el estudio de la fragmentación de ADN ha ido adquiriendo mayor relevancia en las Unidades de Reproducción Asistida, aunque existe una gran controversia acerca de su valor predictivo.

En el laboratorio de andrología, el estudio del semen que se realiza de manera rutinaria, se basa en la guía de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Según los criterios de la misma, el seminograma, consta del estudio de 5 parámetros principales: volumen, pH, movilidad, concentración y morfología; sin embargo, este tipo de estudios sobre la calidad seminal tiene un poder limitado a la hora de predecir el éxito en el resultado de las TRA, ya que aproximadamente el 15% de los varones infértiles presentan un seminograma normal (Guzik DS et al., 2001).

Por ello, surge la necesidad de evaluar la integridad del contenido genético del espermatozoide y la posible relación de alteraciones en la doble cadena de ADN con la infertilidad de origen idiopático masculino (Evenson et al., 1999).

Actualmente, el estudio de la fragmentación seminal está siendo considerado como un nuevo parámetro que puede incorporarse en un estudio básico de semen, a pesar de la controversia que existe en la literatura científica acerca de la influencia del grado de fragmentación espermática y el resultado de la técnica de reproducción realizada (Van der Zwalmen et al., 1991; Janny et al., 1994)

La importancia de determinar el índice de fragmentación espermático radica en la relación que existe entre este parámetro y la tasa de fecundación, tasa de implantación, calidad embrionaria, e incluso la tasa de aborto (Shamsi et al., 2011). Según el estudio publicado por el grupo de Luke Simon en 2011, se observa una correlación entre el nivel de fragmentación, la tasa de fecundación y la calidad embrionaria obtenida. Así mismo, Liv CJ y colaboradores asocian el daño en el ADN espermático con mala calidad embrionaria, bajas tasas de fecundación, menor tasa de implantación y abortos recurrentes (Liv CJ et al., 2011).

Según un estudio de M. Bungum y colaboradores en 2007, en los casos de varones con fragmentación entre 20-30% las probabilidades de conseguir embarazo de forma natural descienden hasta valores cercanos a cero. En cuanto a la inseminación artificial (IA), la probabilidad de obtener fertilización en el caso de elevada fragmentación también es casi nula observando que incluso muestras con un fragmentación del 12% o superior tampoco consiguen embarazo (Duran et al., 2002). Estos resultados defienden que el estudio de la fragmentación del ADN tiene un alto valor predictivo en los resultados de estas dos técnicas.

Cuando el daño espermático supera valores del 30% , habría que recurrir a técnicas más complejas como FIV/ICSI. Aún así, cuando estas parejas se someten a ciclos de FIV/ICSI sólo el 25-30% de ellas consiguen un embarazo a término. Una posible explicación a esta baja tasa de éxito nos la podrían proporcionar estos nuevos marcadores de infertilidad (Bungum et al., 2007).

Según un estudio de Kodama y colaboradores hay evidencias de que marcadores de la integridad del ADN espermático podrían ayudar a diferenciar entre fértil-infértil.

Por todas estas evidencias, se plantea incluir el estudio de la fragmentación del ADN espermático, como un nuevo parámetro de rutina en los laboratorios de andrología, que permita tener un mayor conocimiento sobre la calidad del espermatozoides, dando una visión mucho más completa, y con ello, poder proporcionar a la pareja la TRA más adecuada.

**Etiología del daño espermático**

La mayoría de los varones tienen una subpoblación de espermatozoides con su ADN fragmentado, pero este daño se acentúa en condiciones patológicas y conducen a esterilidad, por eso es importante conocer las causas que provocan las roturas en el material genético del espermatozoide.

• **Factores intrínsecos**

1. **Deficiencia de protaminas:**

Durante el proceso de espermiogénesis se produce el reemplazo de las histonas por proteínas más básicas, las protaminas. Con estas nuevas proteínas se consigue un mayor empaquetamiento del ADN espermático.

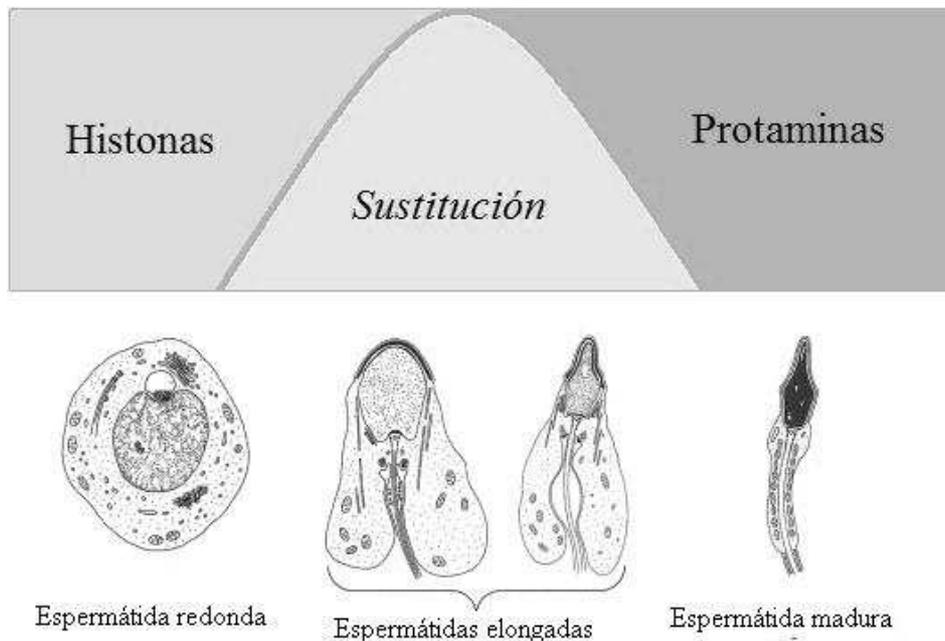


Figura 1: Sustitución de histonas por protaminas durante la espermiogénesis

Los varones infértiles tienen aumentadas las histonas, lo que produce una compactación deficiente y una mayor susceptibilidad al daño en el ADN (Aoki et al., 2005). Además espermatozoides con la cromatina dañada, tienen la capacidad de fertilización disminuida y en caso de fertilización pueden provocar un desarrollo embrionario anormal (M Schiliaker et al., 1994).

## **2. Exceso de ROS:**

Bajos niveles de radicales libres de oxígeno (ROS) son necesarios para una correcta función espermática, pero la presencia de leucocitos y espermatozoides anormales o muertos generan altos niveles de estos radicales libres (aproximadamente el 25% de los varones infértiles tienen los valores de ROS aumentados Zini et al., 1993). El estrés oxidativo producido por estos altos niveles de radicales libres, afecta a la integridad de la membrana del espermatozoide al provocar una peroxidación lipídica, que altera su estructura. Además, afecta al material genético produciendo roturas de las cadenas. (R.J. Aitken et al., 2001).

## **3. Apoptosis:**

Durante la espermatogénesis se produce la muerte celular programada o apoptosis, eliminándose los espermatozoides anormales y evitando así, la superproliferación (Sinha Hikin y Swerdloff, 1999).

Sakkas y colaboradores (Sakkas et al., 2003) propusieron la teoría de que algunos espermatozoides con daño en el ADN, inician el mecanismo de apoptosis y posteriormente escapan del proceso, viéndose en estos casos mayor porcentaje en el eyaculado de espermatozoides con su material genético dañado.

• **Factores extrínsecos**

**1. Tratamientos antitumorales:**

Este tipo de tratamientos, como la quimioterapia o radioterapia provocan daños acumulativos en el ADN espermático, pudiendo llegar a causar esterilidad. Normalmente este tipo de esterilidad es temporal, y meses después de acabar el tratamiento se recupera la espermatogénesis, aunque puede persistir en algunos casos durante años. Además, los varones con cáncer presentan peor calidad espermática incluso antes de iniciar estos tratamientos. (O' Flaherty et al., 2008)

**2. Tabaco:**

El consumo habitual de cigarrillos se asocia con un descenso en la motilidad y la concentración espermática. Este consumo además está relacionado con un aumento de leucocitos y formas anormales que generan altos niveles de ROS y con ello aumento de fragmentación (Potts et al., 1999).

**3. Pesticidas:**

El contacto continuado con estos productos tóxicos está relacionado con un incremento en el daño del material genético del espermatozoide, disminución de la calidad del semen y alteración en los niveles de hormonas sexuales. (Leticia Miranda-Contreras et al., 2013).

**4. Infecciones:**

Las infecciones genitales y los procesos inflamatorios generan un incremento en el número de leucocitos. Estos tipos celulares provocan aumento de los niveles de ROS, y por ello del daño genético (Ereinpress et al., 2002).

## **5. Hipertermia:**

El aumento de la temperatura testicular por encima de los valores normales (35,5-36°C) causa daño en la estructura del material genético debido a que aumenta la proporción de histonas en relación a las protaminas (Banks et al., 2005). Por ello, son susceptibles a este tipo de daño los varones con profesiones como soldadores, cocineros, y personas que pasen mucho tiempo sentados, como camioneros, conductores o taxistas.

### **Detección de la fragmentación de ADN espermático**

El principal inconveniente que surge en el análisis de la integridad del ADN espermático es la falta de estandarización en los test utilizados. Hoy en día se dispone de varios métodos de análisis como SCSA, TUNEL, COMETA, SCD e ISNT, y además no existe un nivel umbral mínimo consensuado a partir del cual considerar una muestra fragmentada.

### **Métodos de Análisis:**

#### **1. TUNEL:**

La técnica se basa en la incorporación de nucleótidos marcados con biotina en los extremos de las roturas del ADN, tanto de cadena simple como de cadena doble. La reacción es llevada a cabo por una transferasa terminal. Tiene como ventaja que es una técnica versátil y está disponible en forma de KIT comercial, pero su uso no se ha extendido más porque requiere un equipamiento sofisticado, personal cualificado y, además, es costosa.

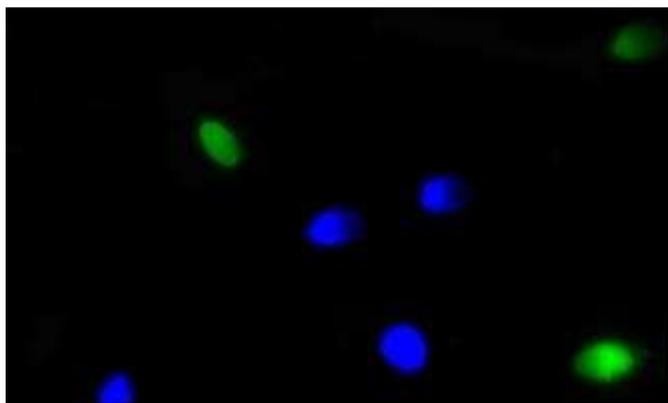


Figura 2: Espermatozoides visualizados con la técnica TUNEL

## 2. SCSA:

Comienza con la desnaturalización de la doble hélice mediante un tratamiento ácido, basándose en la mayor susceptibilidad del ADN fragmentado para ser desnaturalizado. Posteriormente, se marca la muestra con naranja de acridina, la cual emite color verde al unirse a cadena doble, y color rojo cuando lo hace a cadena sencilla sometiendo a las células teñidas a citometría de flujo. Tiene el inconveniente de la tecnología que requiere, ya que no es accesible para la mayoría de laboratorios de andrología.

## 3. COMETA:

Consiste en incluir una muestra de espermatozoides en una matriz de agarosa, y aplicarle una solución de lisis. Se somete a electroforesis y se tiñe con sustancias fluorescentes (DAPI, IP, etc.). Aquellos espermatozoides con su ADN fragmentado al desplazarse por el gel generarán una imagen similar a un cometa, mientras que los que poseen su material genético íntegro no producirán esta imagen. El principal inconveniente es que requiere material no habitual en los laboratorios de andrología, además de personal especializado en biología molecular para la interpretación de los resultados.



Figura 3: Espermatozoides vistos con la técnica Cometa

#### 4. **ISNT:**

La Dna polimerasa es la enzima encargada de incorporar d-UTP, marcados con biotina a las roturas de cadena simple. Se mide el número de espermatozoides que emiten fluorescencia y por tanto estarán fragmentados. No existe de forma comercial para su aplicación directa y, además, tiene poca sensibilidad.

#### 5. **SCD:**

El ADN de los espermatozoides se encuentra unas seis veces más compactado que en las células somáticas, gracias a la acción de las protaminas, y los enlaces disulfuro que se forman entre ellas. La técnica SCD consiste en aplicar un tratamiento ácido que rompe los enlaces disulfuro, y posteriormente, una solución de lisis. Con ello, se consigue relajar los bucles de ADN, dando lugar a la formación de halos de dispersión de la cromatina.

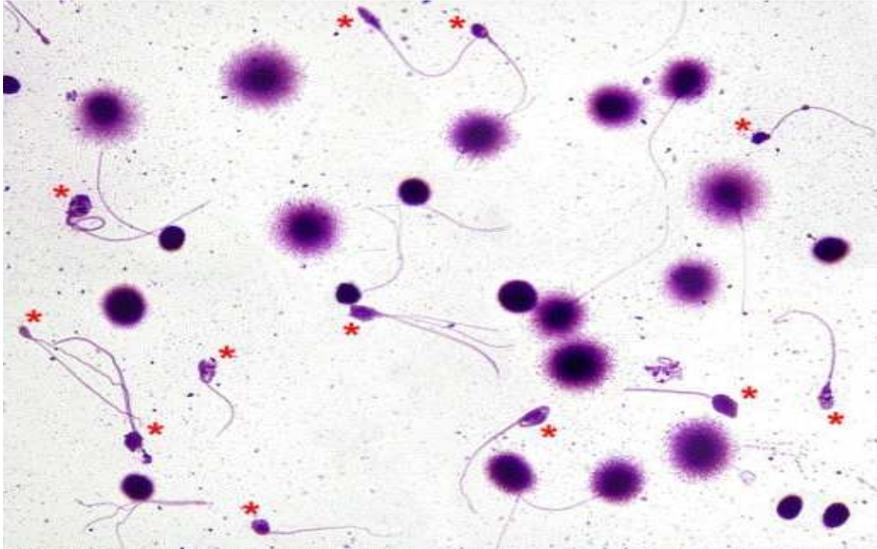


Figura 3: Espermatozoides vistos con un test SCD

Para la interpretación de los resultados solo hay que valorar la presencia/ ausencia de este halo, bajo microscopía de campo claro, por lo que no es necesario grandes equipamientos ni personal altamente cualificado. Se comercializa en forma de kit, lo que facilita su uso en el laboratorio. Además, es una de las técnicas más económicas para la medición de la fragmentación, es rápida, fácil de aplicar, y se pueden procesar varias muestras a la vez. Es importante que no requiere muchos espermatozoides, lo que es importante en casos de varones oligozoospermicos. Por todo esto, la técnica SCD, puede ser potencialmente utilizada como prueba de rutina en los laboratorios de andrología.

### **Importancia clínica**

Una de las principales funciones del espermatozoide es la transferencia del material genético íntegro e intacto hasta el óvulo, lo que es crucial para conseguir una fecundación con éxito. Cuando la cromatina está dañada se producen embriones de mala calidad que dan lugar a bloqueos embrionarios, y por tanto, a futuros abortos (Zini et al., 2001).

Estudios que relacionan los niveles de fragmentación y la tasa de fertilización, muestran que varones con un índice de fragmentación de entre el 20 y el 30% tienen un bajo potencial de fertilización, además cuando la fragmentación es superior al 40%, poseen una muy baja capacidad de fertilizar el óvulo (Bungum et al., 2007; Duran et al., 2002).

La tasa de aborto espontáneo en la población fértil es de un 15-20%, mientras que mujeres con parejas que poseen fragmentación en su ADN espermático presentan un tasa cercana al 38%. Por lo tanto, es posible, que el estudio del daño en el material genético pueda servir como una posible causa de posibles abortos debidos al factor masculino (Carrell DT et al., 2003).

La European Multicenter Study relaciona la tasa de aborto con la edad de los pacientes, y muestra un aumento en el número de abortos cuando la mujer es mayor de 35 años y el hombre de 40 años y se compara con parejas más jóvenes siendo una posible explicación el aumento de fragmentación espermática que sufren estos hombres (Singh et al., 2003). Además, provocan mayor probabilidad de aneuploidías en la descendencia y un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Sartorelli et al., 2001).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Por todo esto, la fragmentación del ADN espermático conlleva un mayor tiempo en conseguir una gestación a término, mala calidad embrionaria, aumento de la tasa de aborto, y mayor riesgo de aneuploidías y malformaciones en la descendencia.

Por otro lado estudios publicados sugieren un cambio de indicación en la TRA a realizar, ya que se ha observado que la tasa de embarazo desciende al realizar IAC cuando el IDF (índice de fragmentación) es elevado; sin embargo, no parece verse tan influenciada al realizar FIV o ICSI (M. Bungum et al., 2004; Saleh et al., 2003). Otros trabajos han visto una tasa de embarazo superior mediante ICSI, en aquellos pacientes cuyo IDF es superior al valor de corte (M. Bungum et al., 2006).

El objetivo de nuestro estudio fue determinar si existe relación alguna entre los parámetros de un seminograma básico y el índice de fragmentación espermático, así como valorar si el resultado de la fragmentación modificaría la técnica indicada en función del diagnóstico del seminograma previo.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio retrospectivo realizado en el Centro Sanitario Virgen del Pilar de San Sebastián desde mayo de 2010, en el que fueron analizados un total de 264 varones.

Las muestras fueron recogidas por masturbación, en botes estériles, con un periodo de abstinencia de entre 2 y 6 días, y con un tiempo de transporte de la muestra inferior a 1 hora.

Aproximadamente 30 minutos más tarde de la recepción de la muestra, y tras observar su licuefacción a temperatura ambiente, se realizó el análisis de los parámetros del seminograma siguiendo los criterios de la OMS del 99 procesando posteriormente las muestras mediante la técnica de *swim -up*.

Las muestras fueron diluidas en proporción 1:1 y posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 400 g; para realizar el swim-up el *pellet* resultante fue incubado en un volumen final de 400 µl de medio de cultivo. Tras 1 hora de incubación a 37°C y un 6% de CO<sub>2</sub>, se recuperó el sobrenadante, contabilizando el número de espermatozoides móviles mediante cámara Makler, procediendo posteriormente al estudio de la fragmentación.

El REM (Recuento de Espermatozoides Móviles) obtenido nos indicará el tipo de técnica a realizar a la pareja en estudio (desde el punto de vista masculino), siendo los criterios de inclusión para cada técnica: mayor de 5 millones se indica una IAC, entre 3 - 5 millones FIV convencional, y menor de 3 millones ICSI.

El análisis de la fragmentación del ADN espermático fue realizado en la muestra capacitada mediante el SCD test (Sperm Chromatin Dispersion), que se basa en la valoración de la presencia/ausencia y tamaño de los halos de dispersión de la cromatina. Para ello se utilizó el kit de *Halosperm* según protocolo.(Fernández JL. et al., 2003). Éste kit comercial contiene tubos eppendorf con una solución de agarosa que es necesario licuar, para ello hay que calentarla en un baño a 100°C durante 5 minutos.

Posteriormente, se transfiere el tubo a un segundo baño a una temperatura de 37°C. Añadimos 50 µL de la muestra seminal capacitada al eppendorf y homogeneizamos la mezcla.

Es necesario tener un portaobjetos pretratado de agarosa a 4°C. Sobre éste se deposita 8 µL de la mezcla del eppendorf, se coloca el cubreobjetos y se vuelve a incubar 5 minutos a 4°C para gelificar la agarosa de nuevo. Pasado estos 5 minutos, se saca el portaobjetos de la nevera y se retira con cuidado el cubreobjetos.

Posteriormente, se incuba el portaobjetos en la solución desnaturalizante durante 7 minutos a temperatura ambiente. Después, se quita el portaobjetos de la solución desnaturalizante, y se incuba con la solución de lisis 25 minutos, con esto, se eliminan gran parte de las proteínas nucleares. Para lavar la solución de lisis, se incuba con abundante agua destilada durante 5 minutos, y finalmente, deshidratar la muestra incubándola durante 2 minutos en gradientes crecientes de etanol. Por último, dejar secar la preparación a temperatura ambiente.

Contaje e interpretación de los resultados:

El porcentaje de fragmentación fue determinado mediante el contaje de 300 espermatozoides por observador a 100X en un microscopio de campo claro bajo aceite de inmersión, siendo cada muestra valorada por dos observadores. El valor umbral utilizado para considerar el porcentaje de fragmentación como alterado fue del 30%.

Con el test SCD, se observan diferentes tipos de espermatozoides:

- Espermatozoides sin halo
- Espermatozoides con halo pequeño
- Espermatozoides con halo mediano
- Espermatozoides con halo grande
- Espermatozoides degenerados: núcleo irregular o débilmente teñido

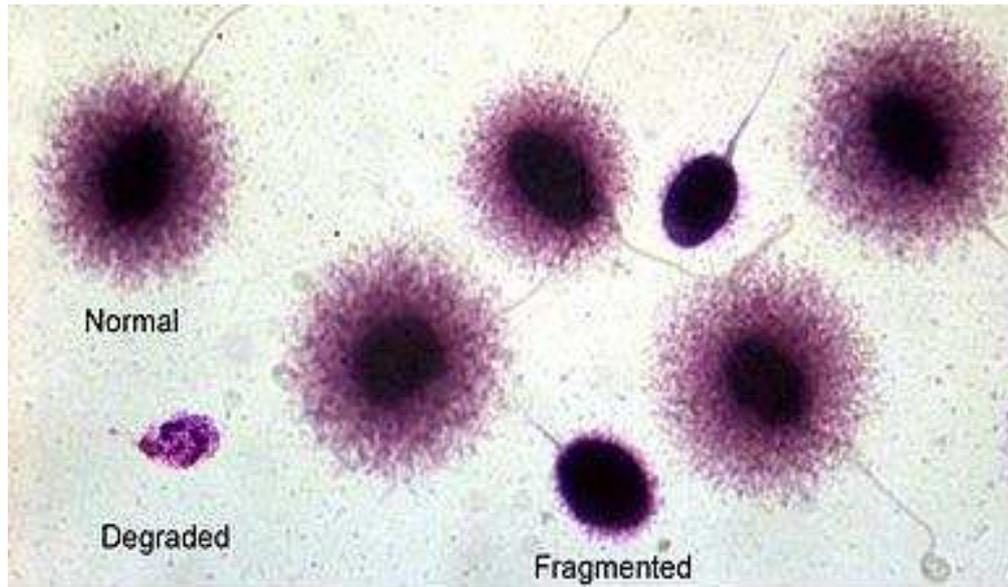


Figura 4: Espermatozoides tratados con el test SCD

Una vez realizado el recuento, se consideran espermatozoides fragmentados aquellos que no tienen halo, los que tienen un halo pequeño (de un tamaño menor a 1/3 del tamaño de su cabeza) y los espermatozoides degenerados. Por tanto, se considera no fragmentados, aquellos espermatozoides que tienen halo mediano y grande.

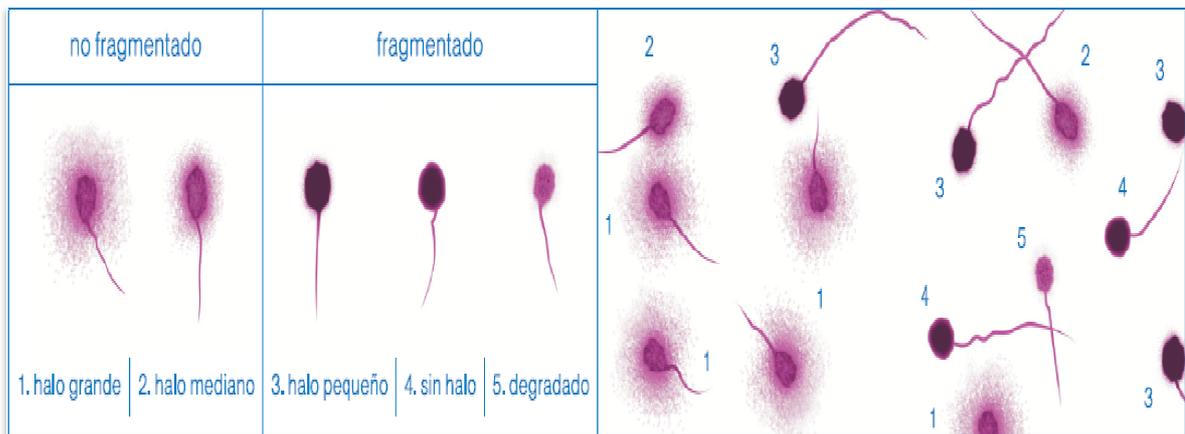


Figura 5: Interpretación del test según el tamaño del halo de dispersión.

Se considera que una muestra está fragmentada cuando se obtiene un índice de fragmentación (SDF) del 30% o superior. Este índice se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de fragmentación SDF (\%)} = 100 \times \frac{\text{Espermatozoides con ADN fragmentado}}{\text{Total espermatozoides contados}}$$

En aquellos pacientes en los que hubo una alteración en la fragmentación, la TRA realizada fue un ICSI, independientemente del resultado obtenido en el estudio del seminograma.

En cuanto al test estadístico utilizado, los datos fueron analizados mediante el estadístico  $\chi^2$ , considerando estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , utilizando el programa SPSS para Windows.

#### IV. RESULTADOS

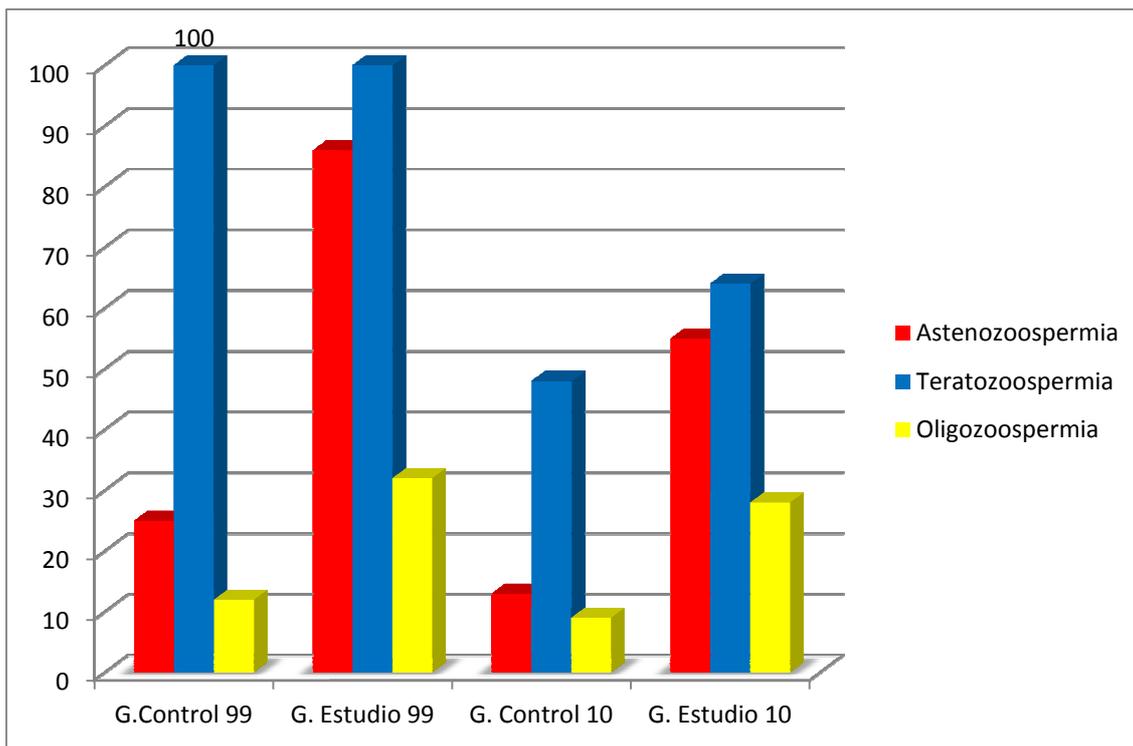
Una vez realizado el estudio de fragmentación y apareciendo material genético dañado en 29 de los 264 varones, la incidencia de fragmentación de ADN espermático ( $IDF \geq 30\%$ ) fue del 11%.

Teniendo en cuenta este dato, los pacientes fueron divididos en dos grupos. Un grupo control formado por los varones con un índice de fragmentación menor del 30% (235) y un grupo de estudio formado por los varones cuya fragmentación era igual o superior al 30% (29). En ambos grupos se analizaron los parámetros de un seminograma normal utilizando los criterios tanto de la OMS 99 como los de la OMS 2010. Los resultados fueron los siguientes:

	Astenozoospermia		Teratozoospermia		Oligozoospermia	
	<i>OMS 99</i>	<i>OMS 10</i>	<i>OMS 99</i>	<i>OMS 10</i>	<i>OMS 99</i>	<i>OMS 10</i>
<b>IDF &lt;30%</b>	59 (25%)	30 (13%)	235 (100%)	112 (48%)	28 (12%)	21 (9%)
<b>IDF ≥30%</b>	25 (86%)	16 (55%)	29 (100%)	18 (64%)	9 (32%)	8 (28%)

Tabla I. Prevalencia de los distintos parámetros que se estudian en un seminograma, según los criterios establecidos por la OMS 99 y 2010.

En la tabla podemos ver la posible asociación entre las principales alteraciones del seminograma y el índice de fragmentación del ADN espermático. Esta relación se muestra más claramente en la siguiente gráfica:



Gráfica 1. Relación entre la fragmentación de ADN y los parámetros del seminograma.

La astenozoospermia, o la baja movilidad de los espermatozoides, tiene una relación directamente proporcional con la fragmentación del material genético en los espermatozoides. Esta relación es estadísticamente muy significativa, ya que presenta una  $p < 0,001$ .

En cuanto a la teratozoospermia, o la presencia de espermatozoides alterados morfológicamente, los resultados sugieren que hay una tendencia que la relacionan una alteración de la morfología con el índice de fragmentación, pero esta relación no es estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Por último, en los datos de varones oligozoospermicos, los cuales presentan una baja cantidad de espermatozoides en el eyaculado, se observa que existe una relación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con fragmentación de ADN espermático elevada.

En la siguiente tabla (Tabla 2), se muestra el cambio de indicación que sufren los pacientes que presentan un IDF  $\geq 30\%$  tras haberles realizado el estudio de la fragmentación de ADN espermático (SCD).

	Total	IAC	FIV	ICSI
IDF $\geq 30\%$	29	13 (45%)	4 (14%)	12 (41%)
IDF $< 30\%$	235	174 (74%)	23 (10%)	38 (16%)

Tabla 2. Número de pacientes a los cuales se cambia la indicación

Basándonos en los resultados de la Tabla 2, se observa que el 45 % de los pacientes con IDF  $\geq 30\%$  tuvieron una indicación de IAC y un 14% de ellos de FIV clásica. Estos datos constatan la indicación que se hace habitualmente con los parámetros del seminograma estudiados y tras realizar capacitación en las muestras seminales. Una vez realizado el estudio de la fragmentación, y basándonos en literatura publicada, como Bungum y colaboradores en 2006, realizamos un cambio de indicación en la técnica a realizar. Por tanto a los pacientes con IDF  $\geq 30\%$  se les realizó un ICSI para mejorar las tasas de embarazo.

En nuestro estudio, vemos como se realiza un cambio de indicación en la técnica a realizar en el 59 % de los pacientes pertenecientes al grupo de estudio (17 parejas), que sin haberles realizado estudios en la integridad de su ADN espermático eran candidatos a IAC o FIV, y ahora, por presentar daños en su material genético (IDF  $\geq 30\%$ ), son derivados directamente a ciclos de ICSI.

## **V. DISCUSIÓN**

Nuestros resultados sugieren la importancia de estudiar la fragmentación del ADN espermático, ya que conocer el IDF es una herramienta valiosa para conocer la capacidad fecundante del paciente y por tanto, puede considerarse como un nuevo marcador de éxito reproductivo.

En cuanto a la posible relación del índice de fragmentación y los principales parámetros del seminograma, se observa una relación muy significativa entre la baja movilidad de los espermatozoides (astenozoospermia) y el daño en el contenido genético. Esta afirmación concuerda con los observado por diferentes autores como Sills et al., 2004, Chen et al., 2006, Cohen-Bacrie et al.,2009, Muriel et al., 2006, Zini et al., 2001 y Lin et al., 2008. Así mismo, nuestros resultados concuerdan con los trabajos citados en la literatura (Tomlinson et al. 2001, Sills et al., 2004 ,Chen et al., 2006 y Zini et al., 2001) observando una mayor incidencia de baja concentración espermática en la población cuyo índice de fragmentación es elevado.

En cuanto a la morfología, a diferencia de otros estudios publicados en los que correlacionan fragmentación y morfología (Tomlinson et al., 2001, Sills et al., 2004 y Chen et al., 2006) nuestros resultados no muestran una clara asociación con la fragmentación espermática, aunque sí una ligera tendencia a ella, que puede ser justificado por el tamaño muestral del estudio.

Por otra parte, basándonos en estudios publicados, en nuestro centro el criterio elegido para indicar la TRA apropiada para cada pareja viene determinada no sólo por los parámetros del seminograma, sino también por el índice de fragmentación. Estudios como Bungum et al., 2004 y Duran et al., 2002 nos muestran la necesidad de un cambio de indicación de IAC a FIV/ICSI, en pacientes con muestras que contienen una fragmentación elevada. Además, según Benchaib et al. 2007 y Bungum et al. 2004, aconsejan que en este tipo de pacientes, la técnica de elección sea un ICSI, ya que han observado un aumento notable en el éxito de los resultados, no solo por poder eliminar la fragmentación de la muestra, sino porque nos permite también, poder seleccionar el espermatozoide con mejor morfología pudiendo, de esta forma, eliminar esta variable.

Además, se ha observado la asociación estadísticamente significativa que tiene con el aborto recurrente (Carrel et al., 2003, Virro et al., 2004 y Zini et al., 2008), así como la correlación negativa que existe entre el nivel de fragmentación, la tasa de fecundación y la calidad embrionaria obtenida (Simon L. et al., 2011).

En definitiva, analizando nuestros resultados, el estudio de la fragmentación debería considerarse como un parámetro de rutina en el estudio del seminograma para poder determinar con mayor fiabilidad la TRA más adecuada a cada paciente. En nuestro trabajo 17 pacientes diagnosticados con un IDF >30% fueron susceptibles de cambio de técnica lo que nos puede ayudar a predecir de forma más personalizada cual es el camino a seguir con cada paciente.

Son necesarios estudios prospectivos para evaluar el efecto de la fragmentación en el éxito de las TRA, así como de los procesos que la originan, con el fin de poder elegir los espermatozoides que posean el ADN íntegro y mejorar los resultados en el laboratorio.

Por todo esto, surge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias que puedan reducir el daño en el ADN espermático.

### ***POSIBLES ALTERNATIVAS PARA PACIENTES CON MUESTRAS FRAGMENTADAS:***

1. **Antioxidantes**: la vitamina C y E, el zinc, el selenio, la carnitina o los carotenoides son algunos de los elementos utilizados como antioxidantes. Éstos deben administrarse durante al menos 72 días, tiempo necesario para completar un ciclo normal de espermatogénesis.

Un reciente meta-análisis, llevado a cabo por Ross y colaboradores en 2010, muestra un incremento en motilidad y tasa de embarazo tras el tratamiento. Otra posible aplicación está relacionada con la criopreservación de semen. En estos casos, las muestras seminales se almacenan en bancos de nitrógeno líquido a una temperatura de -120 °C. Una vez la muestra sea requerida es necesario descongelar el semen, este proceso aumenta el daño en el ADN espermático.

Kalthur G. y colaboradores en 2011 realizaron un estudio en el que suplementaban los medios de congelación con antioxidantes, sus resultados demostraron la eficacia de su uso, ya que se mejoró significativamente la motilidad tras la descongelación y se mantuvo intacta la integridad del ADN.

**2. Espermatozoides testiculares:** gran parte de la fragmentación del ADN espermático se produce en el epidídimo, por lo que técnicas como TESA (aspiración testicular de espermatozoides) y TESE (extracción testicular de espermatozoides) permiten obtener espermatozoides menos fragmentados (Suganuma et al., 2005).

Greco y colaboradores realizaron en 2005 un estudio en el que comparaban los resultados de la ICSI utilizando espermatozoides del eyaculado y espermatozoides testiculares, ambos de 18 hombres con altos niveles de fragmentación. No se observaron diferencias significativas en cuanto a las tasas de fertilización, sin embargo tras la ICSI con espermatozoides testiculares se consiguieron ocho embarazos (cuatro de ellos gemelares) mientras que con los espermatozoides del eyaculado sólo se consiguió un embarazo, que finalmente no llegó a término.

Con estos datos se demuestra que la realización de la ICSI con espermatozoides obtenidos del testículo es una opción eficiente en varones con altos niveles de daño en su ADN.

3. **IMSI:** Inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente con una técnica conocida como *Motile Sperm Organellar Morphology Examination* y un Microscopio con mayor magnificación.

Esta técnica nace en Israel de la mano del investigador Benjamin Bartoov y consiste en incorporar un microscopio de un selector de magnificación, un acoplador de video y una salida de televisión de 355,6 mm. La óptica utilizada es la Normansky. Esto permite la evaluación del espermatozide con detalle y desechando aquellos con un 4% de vacuolas.

La presencia de vacuolas está relacionada con una mayor tasa de fragmentación (Franco et al., 2008), además la posibilidad de escoger los espermatozoides con esta técnica aumenta la calidad embrionaria, la tasa de implantación y de embarazo (Wilding M. et al., 2011).

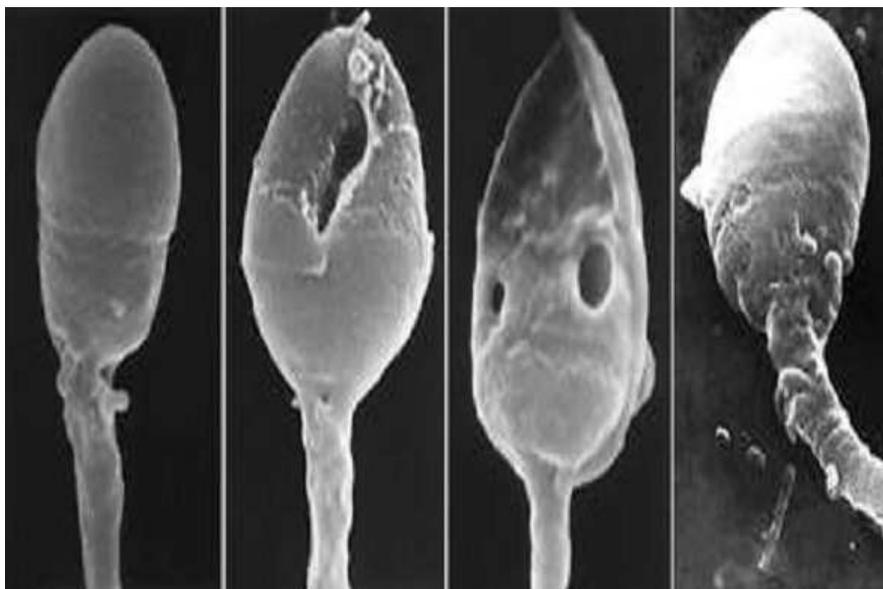


Figura 6: Imagen de espermatozoides para IMSI

**4. MACS:** la apoptosis es un proceso de muerte celular programada que ocurre en las células de manera natural. Una de las primeras señales apoptóticas es la traslocación de un fosfolípido, la fosfatidilserina (PS), a la membrana externa del espermatozoide. Este fosfolípido se encuentra en situaciones normales en la membrana interna, y en respuesta al proceso apoptótico se externaliza. La anexina V se une específicamente a la PS, permitiendo la eliminación de espermatozoides apoptóticos mediante selección celular inmunomagnética (MACS).

La técnica consiste en incubar, la muestra procesada, con microesferas metálicas unidas a anexina V, consiguiendo que los espermatozoides fragmentados se unan por afinidad. Tras la incubación, se pasa la muestra por una columna sometida a campo magnético, consiguiendo así, que los espermatozoides dañados unidos a anexina se frenen en la columna y los no fragmentados se recuperen (Said et al., 2006).

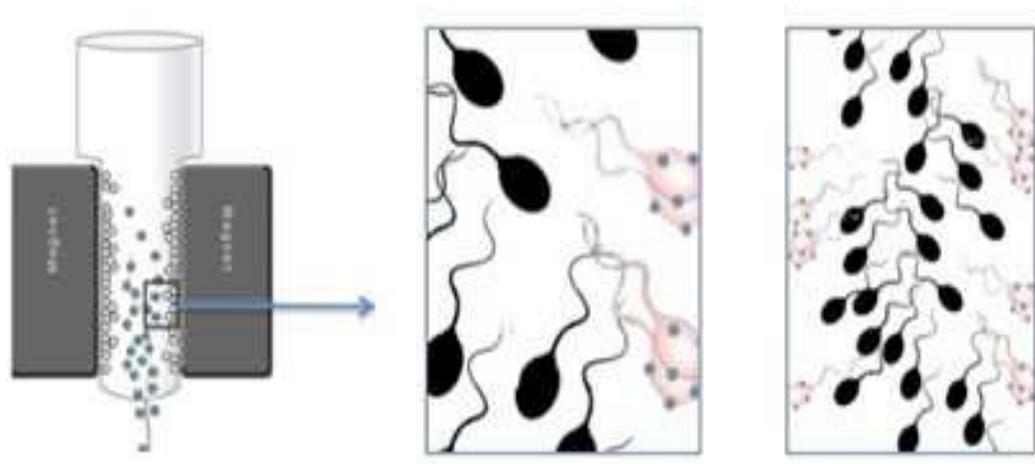


Figura 7: Esquema de la selección espermática mediante MACS

## **VI. CONCLUSIONES**

1. La incidencia de fragmentación de ADN espermático encontrada en nuestro estudio es similar a la que demostraban estudios anteriores.

2. Hay relación estadísticamente significativa entre alta tasa de fragmentación espermática y algunos parámetros de un seminograma básico como, oligozoospermia, teratozoospermia, y astenozoospermia.

3. En nuestro grupo de estudio el 59% de los varones con IDF >30% el resultado del test de fragmentación modificaría la técnica indicada en función del diagnóstico del seminograma previo.

4. El estudio de la fragmentación debería considerarse como un parámetro de rutina en el estudio del seminograma para poder determinar con mayor fiabilidad la TRA más adecuada a cada paciente.

5. Existen alternativas hoy en día eficientes que pueden mejorar los resultados obtenidos a nivel de laboratorio. Lo importante es ofrecer alternativas personalizadas a cada pareja que permitan mejorar y aumentar los resultados obtenidos en las unidades de reproducción asistida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aitken RJ, de Iuliis GN, Finnie JM, Hedge A, McLachlan RI. Analysis of the relationship between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria (2010) *Human Reproduction*; 25: 2415-2426.
2. Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine- deficient human sperm (2005) *Journal of Andrology*; 26: 741-748.
3. Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT, Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa (2005) *Reproduction*; 129: 505-514.
4. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, François Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome (2007). *Fertility and Sterility*; 87: 93-100.
5. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI (2004). *Human reproduction*; 19:1401-1408.
6. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome (2007) *Human Reproduction.*; 22:174-179.
7. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch DW, Hatasaka HH. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss (2003) *Obstetrics and gynecology*; 101: 1229- 35.

8. Chen Z, Hauser R, Trbovich A, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L, Singh NP. The relation between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study (2006). *Journal of Andrology*; 27: 112-120.
9. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménézo YJ, Clement P, Hadimi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients (2009). *Fertility and Sterility*; 9: 1801-1805.
10. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study (2002) *Human Reproduction*; 17:3122-3128.
11. Elza Maria Prestes Sartorelli, Luiz Fernando Mazzucatto, João Monteiro de Pina-Neto. Effect of paternal age on human sperm chromosomes (2001) *Fertility and Sterility*;76:1119- 1123.
12. Erenpreiss J, Hlavicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J, Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples (2002) *Journal of andrology*; 23: 717-723.
13. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects (2006) *Asian journal of andrology*; 8:11-21.
14. Evenson DP, José IK, Marshall D., Utility of sperm chromatin structure assay as a diagnostic and pronostic tool in the humanfertility clinic (1999). *Human Reproduction*; 14:1039-1049.

15. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Alvarez JG. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation (2003) *Journal of andrology*; 24: 59-66.
16. Franco JG, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI (2008). *RBM Online* 17:42-45.
17. Gongora-Rodríguez A, Fontanilla-Ramírez D. The influence of sperm DNA fragmentation on assisted reproduction techniques and embryo quality (2010) *Revista colombiana de ginecología y obstetricia*; 61: 160-164.
18. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL. Sperm Morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men (2001). *New England Journal of Medicine*; 345:1388-93.
19. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality (2000) *Journal of andrology*; 21: 33-44.
20. Janny L, Menezo YJR. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation (1994). *Molecular Reproduction and Development*; 38: 36-42.
21. Kalthur G, Raj S, Thiyagarjan A, Kumar S, Kumar P, Adiga SK, Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage (2011) *Fertility and sterility*; 95: 1149-1151.

22. Lin, M. H., Kuo-Kuang Lee, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryoquality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates (2008). *Fertility and Sterility*; 90:352-359.

23. Miranda-Contreras L, Gómez-Pérez R, Rojas G, Cruz I, Berrueta L, Salmen S, Colmenares M, Barreto S, Balza A, Zavala L, Morales Y, Molina Y, Valeri L, Contreras CA, Osuna JA. Occupational Exposure to Organophosphate and Carbamate Pesticides Affects Sperm Chromatin Integrity and Reproductive Hormone Levels among Venezuelan Farm Workers (2013) *Journal of occupation health*.

24. Muriel L, Mesequer M, Fernández JL, Álvarez J, Remohí J, Pellicer A, Garrido N. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study (2006) *Human Reproduction*; 21: 738-744.

25. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy (2008) *Human Reproduction*; 23: 1044-1052.

26. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte (1992) *The Lancet*; 340: 17-18.

27. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking (1999) *Mutation research*; 423: 103-111.

28. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis (2012) *Human reproduction*; 27: 2908-2917.

29. Said T, Agarwal A, Grunewald SAJ Jr, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander HJ, Thomas AJ Jr, Paasch U. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model (2006). *Biology of Reproduction*; 74:530-537.

30. Sakkas D, Seli E, Bizarro D, Tarozzi N, Manicardi GC, Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis (2003) *Reproductive Biomedicine Online*; 7: 428-432.

31. Shamsi MB, Imam SN, Dada R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility (2011) *Journal of assisted reproduction genetics*; 28:1073-85.

32. Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome (2004) *Asian journal of andrology*; 6: 139- 148.

33. Sills ES, Fryman JT, Perloe M, Michels KB, Tucker MJO. Chromatin fluorescence characteristics and standard semen analysis parameters: correlation observed in andrology testing among 136 males referred for infertility evaluation (2004). *Journal of Obstetrics and gynecology*; 24:74-77.

34. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome (2010) *Human reproduction*; 25:1594-1608.

35. Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success (2011). *Fertility and Sterility*; 95: 652-657.
36. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm (2003) *Fertility and sterility*; 80: 1420-1430.Ç
37. Sinha Hikin AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis (1999) *Review of Reproduction*; 4:38-47.
38. Sukanuma R, Yanagimachi R, Meistrich ML. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI (2005). *Human Reproduction*;20:3101–3108
39. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population of three French regions (1988-1989) (1991) *Human reproduction*; 6:811–816.
40. Tomlinson, M. J., Moffatt O, Manicardi GC, Bizarro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception(2001). *Human Reproduction*; 16: 2160-2165.
41. Van der Zwalmen P, Bertin-Segal G, Geerts L, Debauche C, Schoysman R. Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures (1991). *Human Reproduction*; 581–588.

42. Virro MR., Larson-Cook KL., Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. (2004) *Fertility and sterility*; 81: 1289-1295.

43. Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa (2011). *Journal of assisted reproduction and genetics*; 28: 253-262.

44. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (2010).

45. Zini A., de Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase like activities in seminal plasma and spermatozoa (1993) *International journal of andrology*; 16: 183-188.

46. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT, Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men (2001) *Fertility and sterility*; 75:674-677.

47. Zini A., Boman JM., Belzile E., Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis (2008) *Human reproduction*; 23: 2663-2668.