

Andrología

Influencia de la fragmentación del ADN espermático en la calidad de los embriones en ciclos de ICSI

Influence of Sperm DNA fragmentation to the embryo's quality in ICSI cycles.

Aguilera Duvisón L1, Hebles M2, Migueles B1, González M1, Dorado M1, Sánchez P2, Sánchez F2.

1Fundación Guadalquivir de investigación médica, Sevilla. 2Clínica Ginemed, Sevilla.

Resumen

El objetivo de este estudio es comprobar si la fragmentación del ADN espermático afecta a la calidad embrionaria. En el estudio se han incluido los resultados de 42 ciclos de ICSI que dividimos según la fragmentación del ADN en 23 fragmentados y 19 no fragmentados. Para ello se realiza el test SCD (Sperm Chromatin Dispersión) que mide el grado de fragmentación en el ADN espermático. Tras el estudio podemos determinar que realmente la fragmentación si afecta a la calidad embrionaria, obteniendo un 36,8% de embriones de buena calidad en el grupo de no fragmentados frente a un 8,69% de embriones de buena calidad en el grupo de los que si presentan fragmentación del ADN espermático. Por tanto podemos concluir que la calidad de los embriones procedentes de pacientes con fragmentación patológica es considerablemente de peor calidad que los embriones procedentes de pacientes con una fragmentación dentro de los parámetros normales. Así también podemos decir que la fragmentación es un valor predictivo de la calidad embrionaria.

Palabras clave: Fragmentación del ADN espermático. Calidad embrionaria. Dispersión de la cromatina espermática.

Summary

The aim of this study is to prove the effects of sperm DNA fragmentation on embryo's quality. This study includes the results of 42 ICSI cycles, that were divided attending to sperm DNA fragmentation, 23 with fragmentation and 19 without fragmentation. SCD Tests (Sperm Chromatin Dispersion) that measure the grade of sperm DNA fragmentation were developed. After the study we can determine that sperm DNA fragmentation affects the embryo's quality, obtaining 36,8% good embryo's quality in

Correspondencia: Dra. Laura Aguilera Duvisón
C/ Farmacéutico Murillo Herrera nº 3
41010 SEVILLA
ginemed@ginemed.com
b82agdul@yahoo.es

the group without sperm DNA fragmentation and 8,69% good embryo's quality in group with sperm DNA fragmentation. Therefor we conclude that the embryo's quality is poor in patients with pathologic sperm DNA fragmentation in comparison with patients with DNA fragmentation within the normal range. Also we conclude that Fragmentation is a predictive value of embryo's quality.

Key words: Sperm DNA fragmentation. Embryo's quality. Sperm chromatin dispersión.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad afecta a un 20% de las parejas en edad reproductiva. El factor masculino participa en la etiología de la esterilidad conyugal en la mitad de los casos (1). Principalmente el estudio del varón suele constar de un análisis de semen estándar (seminograma). Este análisis incluye recuento, motilidad, morfología, integridad de las membranas y el acrosoma, sin profundizar en el ADN de esos espermatozoides. Sin embargo aún utilizando este tipo de valores para el diagnóstico de la fertilidad del varón, se estima que aproximadamente un 15% de varones infértiles presentan un seminograma normal (2). Últimamente diferentes estudios nos dicen que los parámetros medidos en un seminograma básico no son suficientes. Se ha observado una importancia creciente en el daño a nivel de ADN que presentan los espermatozoides (3). Para ello se realizan diferentes test entre los que se encuentra el SCD (Sperm Chromatin Dispersión) que mide el grado de fragmentación en el ADN espermático (4). La fragmentación puede estar relacionada, tanto con la fecundación en sí, como con la calidad de los embriones que obtengamos en ciclos de Microinyección espermática (ICSI) (5). Si el ADN del espermatozoide se encuentra dañado puede dar lugar a un desarrollo embrionario anómalo, un fallo de implantación o incluso abortos en fases más tardías (6). Según diversos autores llegando incluso a afectar a la salud del embrión, del feto o del niño nacido en la descendencia. Pudiendo provocar desde la propia infertilidad de este nuevo individuo a estar relacionado con cánceres infantiles o enfermedades de impronta genética (1). Todo ello nos obliga a intentar utilizar espermatozoides con el ADN íntegro. La integridad de esta molécula está asociada con la presencia de roturas, tanto en la doble cadena, como en cadena sencilla. Dicha integridad de la molécula se ve comprometida por diversos factores, tanto intrínsecos, como extrínsecos al propio organismo. La generación de radicales libres de oxígeno, fallos en el intercambio correcto de la fracción histónica de la cromatina por las protaminas, ciertos acontecimientos relacionados con la apoptosis que no funcione bien, así como factores externos tales como el uso de cier-

tos fármacos, el tabaquismo, la contaminación ambiental, una temperatura de testículos elevada provocada por anomalías anatómicas tales como varicocele, los episodios de fiebre alta o la edad avanzada del varón, pueden afectar a la integridad del ADN espermático (6).

El objeto de este trabajo es determinar si dicha fragmentación del ADN espermático influye en la calidad embrionaria y por tanto en el posterior éxito de las técnicas de reproducción in Vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio prospectivo observacional que incluye 42 parejas sometidas a ciclos de ICSI con una edad media de 35,2 (29-43) en el grupo que no presentaba fragmentación y 34,6 (24-49) en el que sí presentaba fragmentación.

De las 42 muestras de semen analizadas en fresco, 23 de ellas tienen una fragmentación superior al 30% y 19 con una fragmentación inferior a dicho punto de corte (4).

Consideramos buena calidad embrionaria cuando en un ciclo tenemos al menos 3 embriones que en día +3 tengan 8 células, simetría en las blastómeras y menos de un 15% de fragmentación.

Las indicaciones para la realización del test de fragmentación del ADN espermático son sémenes de mala calidad, sobre todo Oligo Asteno Terato severa (OTA), un fallo previo de FIV, la presencia de factores tales como varicoceles, edad del varón por encima de los 45 años, abortos de repetición o episodios de fiebres altas en los tres últimos meses.

La fragmentación del ADN espermático se realizó mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD) en muestras de sémenes en fresco sin congelar.

El test se basa en la integridad de los puentes disulfuros que se forman en la compactación de la cromatina de los espermatozoides y las diferencias que existen con respecto a la línea somática. El ADN del espermatozoide se encuentra unas seis veces más compactado que el del cromosoma mitótico. Este ADN se encuentra organizado en bucles de menor tamaño que los de las células somáticas, anclados a la

matriz nuclear (4). Dichos bucles se compactan por acción de las protaminas intercaladas, las cuales estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas. Si se rompen los enlaces disulfuros y se usa una solución específica de lisis para extraer proteínas, los bucles de DNA se relajan constituyendo halos alrededor de la estructura nuclear central residual. Se ha comprobado que, tras un tratamiento ácido previo, aquellos espermatozoides con DNA fragmentado no suelen o ven impedida en gran medida la liberación de los bucles de DNA, mostrando halos muy reducidos o ausencia de los mismos, al contrario que los espermatozoides sin fragmentación de DNA (7). Tras una tinción que se observa en el microscopio de campo claro, hacemos un recuento de los espermatozoides con y sin halos y valoramos el porcentaje de fragmentación del ADN del paciente. El punto de corte que utilizamos es el propuesto por Evenson, es cual establece que la probabilidad de fertilización es cercana a cero cuando el daño presente en el ADN es superior a 30% (4). Aunque existe controversia en cuanto al punto de corte que se cita para las diferentes técnicas y autores, lo que si está claro es que la fragmentación influye tanto en la capacidad de fertilización como en la calidad y desarrollo del embrión (8).

Protocolo de estimulación

Los ciclos de ICSI seleccionados se ha realizado en protocolo largo tras un mes de reposo ovárico con anticonceptivos. Para supresión se han utilizado análogos de la GnRH (aGnRH) (Synarel®) comenzando en el Día 11° del ciclo menstrual previa dosis de 800mg al día y reduciendo a 400mg al inicio de la estimulación. Según los niveles séricos de FSH, LH y estradiol y en función de la edad de la paciente se fija las dosis de estimulación ovárica en protocolo combo con hormonas folículo estimulantes (FSH) (Gonal-F®) y Menotropina (HMG Lépori®). La administración de estos se individualiza de acuerdo al control ecográfico del ciclo. El criterio para la administración de la hormona gonodotrófica humana (1000 UI HCG) (HCG Lépori®) es la presencia de al menos dos folículos de 18 mm. de diámetro. La administración de aGnRH, FSH y HMG se suspende el día de la administración de la HCG.

Las punciones se realizaron a las 36 horas de la administración de la HCG por vía vaginal ecogiada.

Las muestras de semen usadas para ICSI se preparan por gradientes de densidad en capas de 0,3 a 1 mL de 40% y de 0,3 a 1 mL de 80% de Sperm Grad (Vitrolife®) y Ham F-10 (Gibco) con gentamicina. La

centrifugación se lleva a cabo a 1100 rpm seguida de dos lavados de cinco minutos de G-sperm (Vitrolife®) y Gametet (Vitrolife®) (amos suplementados con albúmina) a 1500 rpm, posteriormente se realiza un swim-up hasta la hora de la microinyección con un sobrenadante de 25 a 200 µl de G-Fert. En muestras con escaso número de espermatozoides se somete a una concentración y resuspensión a 1500 rpm con todo el volumen de la muestra y la misma cantidad de G-Fert u se resuspende en un volumen de 25 µl de G-Fert.

La microinyección se realizó entre las 3 y 6 horas de la captación ovocitaria descrita con detalle por Svalander et al (3). Previamente el cúmulo fue eliminado con HYASE 10 en G-Mops en microgotas de 25 µl, ahí se dejaban unos segundos y finalmente pasándolos por micropipetas de distinto diámetro en G-Mop. La fecundación se evaluó entre las 16 y 20 horas. A los tres días de la punción se realizó la transferencia con un máximo de tres embriones de los de mejor calidad. El tratamiento con progesterona se mantiene igual hasta el día de la prueba de β-HCG (dos semanas) y si esta es positiva se mantiene hasta el tercer mes de embarazo.

RESULTADOS

De los 23 ciclos con ADN fragmentado sólo 2 presentan al menos tres embriones de buena calidad, lo que se corresponde con un 8,69%.

De los 19 sin fragmentación, 7 presentan buena calidad embrionaria lo que se corresponde con un 36,8%. (Tabla 1).

Análisis estadístico

Hacemos un estudio estadístico aplicando el test ONE ANOVA y el resultado es que realmente la diferencia es significativa con un $p=0,029$. Por lo tanto podemos decir según este estudio que la fragmentación sí afecta a la calidad embrionaria, pero no a la tasa de fecundación.

DISCUSIÓN

La importancia de la fragmentación del ADN espermático se magnifica cuando hablamos de técnicas de reproducción asistida. La fragmentación puede afectar a la tasa de fecundación (9). Al utilizar estas técnicas se eliminan las barreras de selección natural y en técnicas como la ICSI un espermatozoide con

Tabla 1

Resultados de la calidad embrionaria en ciclos de ICSI en relación con la fragmentación del ADN espermático

	Fragmentados	No fragmentados	
Edad	34,3	35	N.S
Buena calidad embrionaria	8,69%	36,8%	p=0,29
Fecundaciones por ciclo	6,65	5,6	N.S
Tasa de fecundación	64,28%	64,84%	N.S.

fragmentación o anomalías genéticas puede producir fecundación y por tanto dar lugar a un posible embrión anómalo. Nos tenemos que asegurar de seleccionar muy bien los espermatozoides que vamos a utilizar, aunque también el ovocito tiene cierta capacidad para reparar algún daño en el ADN espermático (5). De ahí la importancia creciente en analizar el material genético de los espermatozoides. En este estudio hemos podido comprobar como un alto grado de fragmentación nos da lugar a embriones de mala calidad, lo que nos da una información acerca del éxito que tendrá en la implantación y del resultado global de ciclo de ICSI (10). Por todo esto, realizando un test de fragmentación obtenemos una información adicional de la calidad seminal que es de gran valor predictivo del ciclo y que también nos da información acerca de la calidad embrionaria que podemos obtener en ese ciclo.

CONCLUSIONES

Los parámetros seminales normales no son suficientes en las técnicas de reproducción asistida dada la importancia creciente en el daño del ADN espermático, un valor del estado de este, nos permite predecir con más fiabilidad los resultados del ciclo. Así mismo el nivel de fragmentación nos da una evidencia acerca de algo que ocurre en el organismo. Por tanto el siguiente paso podría ser estudiar porque se está produciendo ese daño, si se puede hacer algo para paliarlo y mejorar la calidad seminal, para acabar consiguiendo el tan deseado embarazo.

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo de Ginemed.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gonsálvez J.:** Evaluación del daño en el ADN espermático
2. **Filicori M, Flamigni C.:** Treatment of infertility: the new frontiers. Princeton Junction, New Jersey: Communication Media for Education, 1998.
3. **Mehdi Benchaid M.D., Ph.D., Jacqueline Lornaga M.D., Ph.D., Claire Mazoyer M.S., Herve Lejeune M.D., Ph.D., Bruno Salle M.D., Ph.D., and Jean François Guerin M.D., Ph.D.:** Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome.
4. **Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Álvarez JG.:** The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation.
5. **Nelly Frydman Pharm. D, Nadia Prisant M.D., Laetitia Hesters Pharm. D., René Frydman Ph.D., Gérard Tachdjian Ph.D., Paul Cohen-Bacrie Pharm. D., And Renato Fanchin Ph.D.:** Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation.
6. **Agarwal A. y Allamaneni SSR.:** Sperm chromatin defects in the etiopathogenesis of male infertility.
7. **José Luis Fernández M.D., Ph.D., Lourdes Muriel Ph.D., Vicente Goyanes M.D., Ph.D., Enrique Segrelles M.D., Jaime Gonsálvez Ph.D., María Enciso Ph.D., Marie LaFromboise B.S., and Christopher De Jorge Ph.D.:** Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test.
8. **Benchaid M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al.:** Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique.
9. **Larson KL, DeJonges CJ, Barnes AM, Jost LK and Evenson DP.:** Sperm Chromatin Structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques.
10. **Benchaid M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, and Guérin JF.:** Sperm DNA Fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique.