

Fragmentación del ADN espermático ¿un concepto dinámico o estático?

Sperm DNA fragmentation a dynamic or static concept?

Gosálvez J¹, Núñez-R², Caballero P², Fernández JL³, Cortés-Gutiérrez E⁴, López-Fernández C¹

¹Departamento de Biología. Unidad de Genética. Universidad Autónoma de Madrid (UAM). 20849-Madrid. España.

²Clínica Tambre. C/ Tambre 8. 28002. Madrid, España.

³INIBIC-Genética, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, As Xubias, A Coruña, España.

⁴Departamento de Genética. Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social. 64720-Monterrey. México.

Resumen

Objetivo: *El propósito de este estudio es demostrar que la cromatina del espermatozoide, tanto en humanos como en otros mamíferos, cuando se manipula para ser utilizado en técnicas de reproducción asistida, se ve sometido a una situación de estrés que se traduce en un incremento progresivo en los niveles de fragmentación de la molécula de ADN.*

Material y métodos: *Se utilizaron 10 donantes humanos con fertilidad probada tras haber obtenido 6 embarazos y 10 sementales de morueco, 10 de caballo y 10 de toro. Todas las muestras se congelaron y descongelaron en condiciones óptimas. El estudio de la dinámica de la fragmentación se realizó tras incubación de los espermatozoides a 37°C durante un período máximo de 48h. La fragmentación del ADN se analizó utilizando la metodología SCD (Halosperm® para el caso de humanos y Halomax® para el caso de otros mamíferos).*

Resultados: *El proceso de la fragmentación del ADN en el espermatozoide es un proceso dinámico y existen diferencias significativas en la velocidad de fragmentación de las distintas especies de mamíferos que se han analizado, siendo muy elevada en el caso del morueco, media para el caso del humano y el caballo y baja en el caso del toro. Adicionalmente, también se pueden detectar diferencias entre los individuos de cada especie. Los resultados obtenidos indican que la fragmentación del ADN puede ser un efector importante de la disminución rápida en la calidad seminal a medida que transcurre el tiempo, dado que la molécula de ADN tiende a degradarse de forma rápida tras la descongelación.*

Conclusiones: *1) La fragmentación del ADN en muestras de espermatozoide congelado es un proceso dinámico característico de cada especie. 2) Las muestras de semen congelado deben de utilizarse sin ninguna dilación tras ser descongeladas. 3) El estudio de la variación intraindividual en la dinámica de*

Correspondencia: Dr. Jaime Gosálvez
Departamento de Biología.
Unidad de Genética.
Universidad Autónoma de Madrid (UAM).
20849 Madrid. España.
Email: jaime.gosalvez@uam.es

la fragmentación se podría utilizar como método de discriminación entre muestras de semen que tienen una alta o una baja velocidad de fragmentación. 4) Los resultados obtenidos sobre los niveles de fragmentación que se registran entre distintos laboratorios e incluso dentro del mismo laboratorio, pueden no ser comparables si no se hace referencia explícita al tiempo de recolección de la muestra, condiciones de mantenimiento de esa muestra y el momento del análisis.

Palabras clave: Fragmentación del ADN. Espermatozoides. Andrología. Fertilidad. Calidad seminal.

Summary

Objectives: *The aim of this study was to demonstrate that the sperm DNA in humans and other mammals, when manipulated for assisted reproduction techniques, is stressed and causes a progressive increase in the basal level of DNA fragmentation.*

Materials and methods: *10 human donors with proven fertility and 10 stallions, 10 rams, and 10 bulls were also included in the analysis. All samples were frozen and thawed under optimum conditions. The dynamic assessment of sperm DNA fragmentation took place after incubation of the sperm samples at 37°C for a maximum period of 48 hours. Sperm DNA fragmentation was analyzed using the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test methodology (Halosperm® for the case of human and Halomax® for the case of other mammals).*

Results: *Sperm DNA fragmentation is a dynamic process and there are significant differences in the velocity of DNA fragmentation when different mammalian species are compared. According to the results here found, this velocity could be considered as very high in the case of ram, medium in the case of human and the horse and low in the case of bull. Additionally, differences can also be detected among individuals within the same species.*

Conclusions: *1) The fragmentation of DNA in frozen semen samples is a dynamic process characteristic for each species 2) The immediate use of frozen semen samples, without any delay after thawing, is highly recommended 3) The study of the intra-individual variation in the dynamics of sperm DNA fragmentation could be used as a method of discrimination among semen samples that present a high or a low velocity of DNA fragmentation 4) Within this scenario, the results of sperm DNA fragmentation as reported between different laboratories and even within the same laboratory, may not be comparable without explicit reference to the time of sample collection, conditions for maintenance and the time when the analysis was performed considering time of collection.*

Key words: DNA fragmentation. Spermatozoa. Andrology. Fertility. Semen quality.

INTRODUCCIÓN

La eficacia biológica se relaciona de forma directa, además de con otros factores, con la presencia de células germinales de una alta calidad. En el caso del ser humano y muy probablemente asociado al modelo de hábitos sociales generados tras la revolución industrial, la calidad de las células germinales se ha resentido en cierta medida. De hecho, en el mundo desarrollado ya no podemos asumir con tanta facilidad que cualquier pareja puede concebir sin recurrir a tecnologías de reproducción asistida, bien sean de alta o baja intensidad. De esta forma, en el caso de los humanos, surge la percepción de esterilidad como un concepto que afecta no sólo a la descendencia y por tanto a un modelo so-

cial estructurado y sostenible, sino también al equilibrio psicológico de los individuos que se ven afectados. La esterilidad se entiende como la incapacidad que presenta una pareja para concebir, tras intentarlo de forma regular durante un periodo de 12 meses, sin por ello obtener los resultados esperados. Un estudio sobre la probabilidad que tendría una pareja fértil de concebir, asumiendo una vida sexual activa y en edad comprendida entre los 20 y los 30 años, daría como resultado que aproximadamente un 10% de las parejas tendrá dificultades para procrear. Lo fatídico de esta situación es que esta tendencia va en aumento. Desde este punto de vista, habría que asumir que la eficacia biológica del ser humano, como especie, puede verse alterada.

Debido a que la reproducción es un proceso biológico extremadamente complejo, no existe ninguna prueba definitiva que ofrezca un pronóstico exacto de la fertilidad de una pareja (1). Las alteraciones en el varón pueden suponer el 50% de los casos de infertilidad y en muchos casos se asocian con una baja calidad del semen. En la mayoría de las situaciones, la causa posible de infertilidad masculina puede determinarse mediante estudios andrológicos, ya que las características que debe cumplir una muestra de esperma para conseguir una fecundación normal, están bien establecidas (1). De todas formas, aún realizando este tipo de análisis, se ha determinado que alrededor de un 15% de los varones estériles presentan un espermiograma normal (2), e individuos con parámetros seminales considerados anormales pueden ser fértiles. Por lo tanto, parece ser que, incluso la buena determinación de estos parámetros, no es absolutamente informativa sobre la calidad de los espermatozoides presentes en una muestra seminal. La conclusión final es que ningún parámetro considerado de manera aislada se puede considerar de valor diagnóstico absoluto de la infertilidad masculina (3). En consecuencia, un estudio seminal en el que se integren diferentes parámetros parece ser la mejor de las opciones para entender la infertilidad.

Entre todos los parámetros que se estudian para determinar la calidad seminal existe uno que ha despertado un gran interés en los últimos años: la fragmentación de la molécula de ADN (4, 5). Este parámetro tiene un interés evidente dado que la transferencia de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al óvulo, es esencial para conseguir la gestación de un individuo normal. El ADN nuclear presenta una serie de discontinuidades entre los cromosomas que serían equivalentes a las roturas de la doble cadena del ADN, pero que, en condiciones normales, quedan selladas por los telómeros. Estos extremos cromosómicos en realidad generan un número de cromosomas estables para cada especie, y corresponderían a "roturas biológicamente correctas". Es decir, un núcleo diploide, en el que su ADN se haya replicado para posteriormente generar dos nuevas células, por ejemplo cualquier célula en profase de meiosis, deberá presentar $8 \times n$ "roturas biológicamente correctas", siendo n = número de cromosomas haploide de la especie en cuestión, esto es, el número de cromosomas que transporta un espermatozoide. Tan sólo una rotura extra de la doble cadena de ADN en cualquier lugar de la molécula y que no fuera adecuadamente reparada por los mecanismos de reparación, puede entrañar problemas a la célula que la posea y a su descendencia. En otras palabras, las

roturas de doble cadena que se producen y persisten en el ADN son fuertes condicionantes de la estabilidad de los cromosomas en las siguientes divisiones celulares y si estas se presentan en los espermatozoides, pueden ser transmitidas en el momento de la fecundación.

Sin embargo, en el análisis de cualquier muestra seminal se encontrará, con mayor o menor frecuencia, espermatozoides que presentan su ADN fragmentado y quizás debiéramos estudiar este fenómeno en mayor profundidad para entender hasta que punto esta anomalía puede llegar a influir en los resultados tanto cualitativos como cuantitativos de la descendencia. Sobre la naturaleza del daño en el ADN registrado en el espermatozoide, nos enfrentamos con toda seguridad a un efecto de naturaleza multifactorial y no del todo delimitada y/o esclarecida. Se sabe que la generación de radicales libres asociados a procesos REDOX (6, 7), errores en la sustitución correcta de la fracción de histonas en la cromatina por las protaminas, o deficiencias en la recombinación pueden producir daño irreversible en el gameto (8). En relación directa con este tipo de acontecimientos, la presencia de apoptosis, como un suceso de muerte celular programada, tiene lugar durante el proceso de formación de las espermátidas en las paredes de los túbulos seminíferos del testículo (9, 10). En este caso, las células de Sertoli, presentes también en las paredes de dichos túbulos, fagocitan y limpian los residuos celulares. No obstante, es interesante destacar que si la incidencia del fenómeno apoptótico tiene lugar tras la salida del espermatozoide a la luz de los túbulos seminíferos, podrían generarse una serie de metabolitos presentes en el líquido seminal, que no serán retirados una vez que se ha producido la eyaculación y que podrían contribuir a acelerar el proceso de degradación del ADN de otros espermatozoides. Esta situación podría ser especialmente crítica cuando se maneja semen de eyaculado para una posterior inseminación o cuando las muestras se congelan. En estas circunstancias se generaría un acopio no deseable de metabolitos altamente reactivos, tales como enzimas celulares, enzimas procedentes del acrosoma, nucleasas y enzimas de remodelación de la cromatina, como la topoisomerasa, que pueden ser activas sobre núcleos espermáticos normales. En este escenario de daño directo o indirecto sobre la molécula de ADN del espermatozoide, se ha sugerido que la salud del embrión, la del feto, e incluso la de la descendencia, pueden verse afectada (11, 12). Además, se ha propuesto que el efecto de este daño puede asociarse a enfermedades que aparecen en la descendencia, tales como la propia infertilidad (13, 14), la presencia de cáncer en la niñez (15),

o bien puede relacionarse con ciertas enfermedades de impronta genómica anormal (16). En resumen, parece elemental que la valoración de los niveles de fragmentación en el ADN en el espermatozoide de cualquier especie tiene un interés obvio. Sin embargo, en este momento hay que asumir que determinados aspectos del daño que sufre la molécula de ADN en el espermatozoide requieren de un estudio pormenorizado, ya que son todavía muchos los puntos oscuros que tendremos que despejar para poder obtener toda la información potencial que nos ayude a canalizar y entender mejor los problemas de infertilidad.

Curiosamente, las estimas de la fracción de espermatozoides con ADN fragmentado siempre tienen un carácter estático. Independientemente de la metodología que se utilice, los valores que se le atribuyen, tan sólo hacen referencia al valor en sí mismo. En muy contadas ocasiones se explicita si esos valores corresponden al momento después de la eyaculación, o después de ser transportados y manejados en el laboratorio. Habitualmente no se hace referencia a circunstancias relacionada con el tiempo y las condiciones de manejo del espermatozoide. En este caso, si existiera una tendencia hacia el aumento a lo largo del tiempo de los niveles de fragmentación, los resultados obtenidos entre muestras distintas no serían comparables. La hipótesis de trabajo que se plantea en este experimento establece que la fragmentación del ADN en el espermatozoide humano una vez eyaculado, al igual que debe suceder en otras especies, tendería a aumentar con el tiempo. Sin embargo, esa tendencia hacia un aumento progresivo no afectaría de igual forma a todos los individuos o especies por dos razones esenciales 1) el nivel de daño basal entre distintos individuos no es idéntico y 2) el fondo genético de cada individuo/especie es propio de ese individuo/especie. Es decir, la fragmentación del ADN en el espermatozoide humano, al igual que debe ocurrir en otras especies, es un proceso dinámico y por lo tanto variable en el tiempo, con una tendencia hacia el aumento una vez que este se maneja de forma extracorporal. El objetivo de esta investigación es analizar cuales son los patrones temporales de degradación del ADN del humano frente al que presentan otras especies, en un intento de entender algo más acerca de la esterilidad que se puede llegar a producir cuando manejamos muestras de semen en los procesos ordinarios de reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio piloto se plantó utilizando muestras congeladas de espermatozoides humanos procedentes de

10 donantes con fertilidad probada, al haber concebido 6 hijos por varón, de acuerdo con la legislación española vigente. Tras analizar la dinámica de fragmentación del ADN en estas muestras, se amplió el análisis a otras especies de mamíferos con objeto de comprobar si la tendencia observada en humanos era común y extrapolable a otras especies. De esta forma se incluyeron en el estudio muestras, también congeladas, de semen de morueco, caballo y toro. En todos los casos el número de muestras procesadas por especie también fueron 10.

Todas las muestras de semen se almacenaron en nitrógeno líquido y se congelaron de acuerdo con los estándares de dilución y productos de preservación espermática requeridos para mantenerlas en las mejores condiciones durante y tras su descongelación. Las muestras de semen humano proceden del banco de semen de la Clínica Tambre, mientras que las correspondientes al resto de mamíferos son muestras comerciales adquiridas en distintos centros de genética y pertenecientes a sementales de alto valor genético y reproductivo contrastado. Las muestras de morueco se obtuvieron en Ovigen (Centro de Selección y Mejora Genética de Ovino y Caprino, Zamora) y correspondían a la raza Assaf, las de caballo se obtuvieron del FRCCDD en Ávila y correspondían con la raza de caballo español y las de toro procedían de Aberekin S.A. (Centro de Inseminación, Derio, Bizkaia) y correspondían con la raza Hosltein. En todos los casos, para la congelación de las muestras, se utilizaron los diluyentes y las rampas de enfriamiento específicas para cada especie, según certificación de los distintos centros.

Para el estudio de la dinámica de la fragmentación post-congelación, cada muestra de semen se descongeló por inmersión rápida en agua a 37°C durante un periodo de 30 segundos. El contenido se transfirió a un tubo eppendorf esterilizado que se incubó durante un periodo variable de tiempo en una estufa a 37°C y con una tensión de CO₂ de un 5%. Los tiempos máximos de incubación de las muestras variaron entre las distintas especies y oscilaron entre las 48 horas utilizadas para humano, oveja y caballo y los 10 días utilizados en el caso del toro. Se tomaron muestras para el análisis de la fragmentación a tiempos variables. T0 fue considerado como el nivel basal de fragmentación de la muestra registrado tras la descongelación.

Posteriormente se obtuvieron alícuotas a 1,5h, (T1,5), 4h (T4), 8h (T8), 24h (T24) y 48h (T48). La idea básica del experimento era emular lo que podría suceder con la fragmentación del ADN una vez que el espermatozoide descongelado se enfrenta a un oocito, bien por inseminación asistida, bien por FIV.

La fragmentación del ADN se analizó de forma inmediata a la obtención de la muestra en el tiempo correspondiente. En todos los casos se utilizó la metodología Sperm Chromatin Dispersion - SCD- (17) en sus variantes comerciales (Halosperm(r) para el caso de humanos o bien Halomax(r), para el caso de animales; Halotech-DNA S.L., Madrid, España). Los detalles técnicos del proceso se han descrito en diferentes publicaciones, tanto para el caso de humanos como para el de animales (18, 19, 20, 21, 22).

Las muestras procesadas una vez deshidratadas se tiñeron con diferentes fluorocromos tales como EvaGreen (Biotum, Hayward, CA, USA), yoduro de propidio o 2,4-diamidinofenilindol -DAPI- (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) o bien en campo claro utilizando una solución de colorante de Wright (Merck, Darmstadt, Germany) 5% en un tampón fosfato libre de Ca y Mg. Las preparaciones para su utilización en fluorescencia se analizaron con el módulo Sperm Class Analyzer (Módulo ADN; Microptic, Barcelona, España) montado sobre un microscopio Nikon Elipse 600 equipado con una platina motorizada (Prior Houston, Texas).

El sDFI (sperm DNA Fragmentation Index) se definió como el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado, obtenidos tras estudiar 500 espermatozoides en cada muestra.

RESULTADOS

Visualización de la fragmentación de ADN espermático con el método SCD

La idea base del test SCD reside en producir una descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto. Para ello se utiliza un tratamiento de desproteínización controlada que facilita la relajación de los bucles de cromatina en el espermatozoide. En el caso de las muestras de espermatozoides humanos, la variante metodología del SCD utiliza un tratamiento doble que incluye una desnaturalización seguido de una desproteínización. En el primer caso se pretende producir una desnaturalización del ADN, utilizando como punto de partida aquellas roturas de cadena doble o de cadena sencilla presentes en la molécula de ADN, y en segundo, eliminar las proteínas para relajar la cromatina. Tras tinciones convencionales, bien sea para microscopía de campo claro o utilizando fluorocromos normales, los espermatozoides que presentan el ADN fragmentado no presentan un halo vi-

sible de dispersión de la cromatina o si lo hacen estos de muy pequeño tamaño (Figura 1a). Por el contrario, los espermatozoides sin fragmentación en su ADN generan halos compactos de relajación de los bucles de cromatina (Figura 1c, d).

A diferencia de lo que ocurre con el espermatozoide humano, tras aplicar la técnica SCD en el caso de los animales, cuyo proceso se ciñe a la utilización de una desproteínización controlada, los espermatozoides que contienen ADN fragmentado presentan un gran halo de difusión de los fragmentos de cromatina (Figura 1 f), mientras que aquellos que no están afectados por roturas en su ADN, bien no presentan halo de bucles de cromatina o este es de tamaño muy reducido y compacto (Figura 1e).

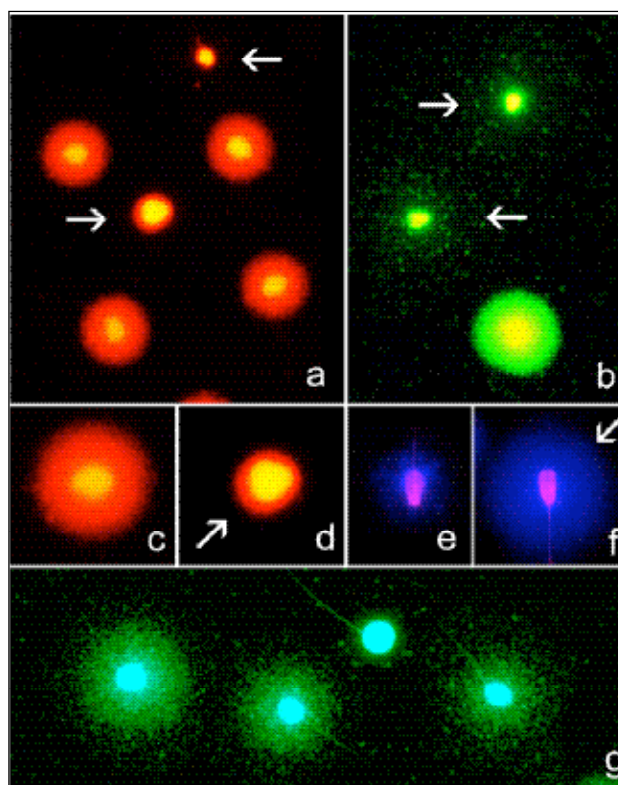


Figura 1

Visualización de la fragmentación del ADN tras la utilización de Halosperm(r) (a-d) en humanos y Halomax(r) (e-g) en animales. a) Tinción con yoduro de propidio b) Tinción con Eva-Green. Nótese el halo de dispersión en los núcleos con ADN fragmentado formado por fragmentos mínimos de ADN. Las flechas en a y b corresponden con núcleo que contienen ADN fragmentado. c-f) Núcleos seleccionados para una comparación de la visualización del ADN no fragmentado (c) y fragmentado (d) en humanos y fragmentado (e) y no fragmentado (f) en toro. g) varios núcleos conteniendo ADN fragmentado muestran un halo de dispersión grande en el caso del morueco.

En realidad esta diferencia entre “no halo” en el caso de humanos para ser asociada con presencia de ADN fragmentado y “halo” en el caso de otros mamíferos para identificar espermatozoides con ADN fragmentado, se debe a la habilidad de los colorantes utilizados y al método de tratamiento en cada especie para generar los halos. La realidad es que en el caso de los humanos, los espermatozoides en los que no se identifican halos de expansión, no quiere decir que estos no existan. Existen, pero debido al tratamiento utilizado, la dispersión de la cromatina es muy grande y los fragmentos de ADN muy pequeños, con lo cual sólo pueden ser visualizados tras utilizar fluorocromos de muy alta sensibilidad como los pertenecientes a la familia de los Synergy Brand, Eva Green o equivalentes. En la figura 1 se muestran dos núcleos equivalentes en nivel de fragmentación tras tinción con un fluorocromo estándar como el yoduro de propidio (Figura 1a) y con EvaGreen (Figura 1b). En el segundo caso se observa un extenso halo de dispersión de la cromatina que no es visible con otros fluorocromos o con tinción para campo claro. Por lo tanto, en realidad, el método SCD está produciendo halos en aquellos espermatozoides que contienen ADN fragmentado tanto en el caso de humanos como en el caso de otros mamíferos, pero en el primero no es fácil de visualizar.

Si en el caso de los humanos se utiliza la técnica de desproteínización directa sin desnaturalización previa, el tamaño de los halos que se produce es muy variable y es relativamente frecuente la dificultad para diferenciar los espermatozoides que tienen el ADN afectado y los intactos.

Más aún, la desproteínización controlada que se consigue tras la aplicación del método SCD en todas las especies, genera unos halos de relajación de la cromatina en espermatozoides que se consideran que no presentan ADN fragmentado que no son homogéneos para todos los espermatozoides. Este efecto es particularmente obvio en el caso de los espermatozoides humanos y se traduce, tanto en variaciones en el área del halo de difusión de fragmentos que se genera, como en la distribución de la densidad de los bucles de relajación de la cromatina. Este efecto es claramente visible tras la aplicación directa de filtros electrónicos a las imágenes digitales obtenidas en fluorescencia (Figura 2). Las imágenes de fluorescencia directamente digitalizadas son susceptibles de ser filtradas y con ello realizar o eclipsar bandas de información que ayuden a discriminar de forma evidente posibles diferencias en la densidad de la cromatina que se desorganiza y en la expansión de los halos. En la figura 2a se muestra una imagen directamente obtenida del microscopio, mientras que la figura 2b corresponde al resultado obtenido

tras la aplicación del filtro que se diseñó para este caso (Figura 2c). El filtro es sencillo y puede ser autodiseñado en cualquier procesador de imágenes. Básicamente, consiste en la supresión suavizada de la banda de información correspondiente a los valores medios comprendidos entre 55 y 65, en una escala de grises correspondiente a la acumulación de la información en los tres canales genéricos (RGB), y generar un incremento hasta los niveles 200 de la información comprendida entre los valores ≤ 55 y ≥ 65 . Si este filtro se aplica de forma homogénea a imágenes que se capturan con los mismos tiempos de exposición, genera una redistribución de la información en la que se resaltan diferencias existentes entre los halos correspondientes a los espermatozoides que contienen ADN no fragmentado (Figura 2d) y ADN fragmentado con diferente intensidad (Figura 2e y 2f).

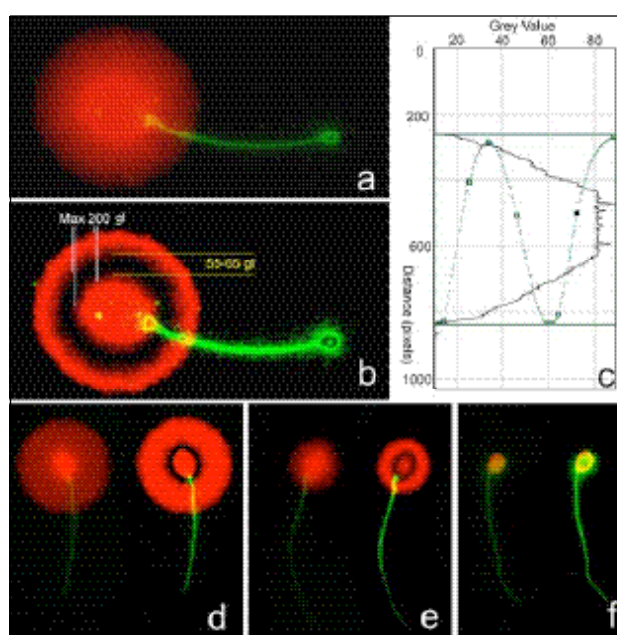


Figura 2

Proceso de filtrado en espermatozoides humanos para resaltar las diferencias entre las densidades de distribución de la cromatina tras el proceso SCD. Ver texto para detalles. a-d) Espermatozoides con ADN sin fragmentar. e-f) Espermatozoides con ADN fragmentado. c) Densitometría del núcleo mostrado en figura (a) y detalle del filtro aplicado para producir la imagen (b). Ver portada de la revista para un campo general.

Dinámica de la fragmentación del ADN espermático en humanos

En las muestras de espermatozoides humanos sometidas a estudio, la distribución de los valores para la fragmenta-

ción del ADN en su nivel basal, osciló entre un 8 y un 23% (Figura 3a). Sin embargo, en todos los casos, estos valores se incrementaron después de que las muestras se incubasen a 37°C (Figura 3a). El aumento en los niveles medios de sDF es perceptible transcurridos 90 minutos.

Con objeto de obtener una primera visión integrada de la posible correlación entre el incremento observado en el sDFI y el tiempo transcurrido, se realizó un análisis de regresión de las distintas tendencias presentadas por cada individuo. Dado que el valor de p obtenido es inferior a 0,01 (Tabla 1), hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 99%. Es decir, se está produciendo un incremento efectivo de la fragmentación del ADN en el tiempo. Lo interesante del análisis es que la pendiente en la recta de regresión que se obtiene para cada individuo es distinta, lo que genera una serie de cruces entre las distintas tendencias como un reflejo de la distinta velocidad de fragmentación que se está produciendo en cada individuo (Figura 4a). En términos medios, se estima que la velocidad de degradación transcurridas 4 horas de la incubación supone un incremento de la fragmentación del ADN espermático del orden de un 7,4% por hora sobre los niveles de fragmentación basal.

Por otra parte el análisis de regresión muestra otro aspecto interesante tanto al estudiar tanto el valor de R^2 como en el error medio absoluto de los residuos

(EAR). Un valor alto de R^2 y un valor bajo para el EAR indican un mejor ajuste de las distintas regresiones (Tabla 1).

Dinámica de la fragmentación del ADN espermático en otros mamíferos

En el caso de los otros mamíferos incluidos en el estudio, los niveles basales de sDFI fueron relativamente bajos en el caso del toro y del morueco, que no excedieron el 10% y el 15% respectivamente para los valores mayores de sDF observados (Figura 3b, c). Sin embargo, en el caso del caballo, el rango de variación de los sDFI fue más amplio y se detectaron individuos con sDFI basal cercano a un 30%.

En todos los casos existe una relación directa entre la variable tiempo de incubación y el incremento de los niveles de fragmentación observados. Sin embargo, tanto las pendientes que se obtuvieron para las distintas especies como los valores de R^2 y EAR fueron distintos (Tabla 1). Las especies que ofrecieron comportamientos similares para la dinámica de la fragmentación fueron el humano y el caballo, siendo el ajuste mayor en el caso del caballo (Tabla 1). En lo que se refiere a la velocidad de la fragmentación estimada para cada especie a las 4 horas de incubación, se observa que la menor longevidad -mayor velocidad de fragmentación- del ADN espermático corresponde

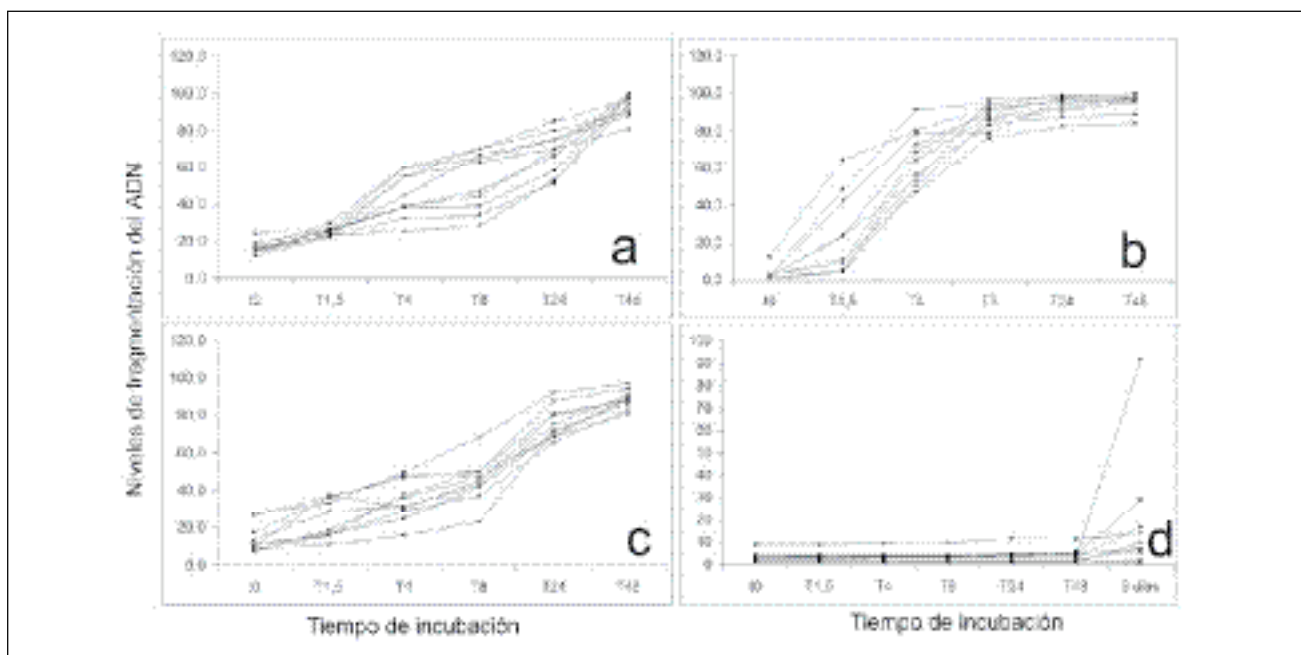


Figura 3

Distribución de los valores de fragmentación del ADN a lo largo del periodo de incubación en humanos (a), morueco (b), caballo (c) y toro (d).

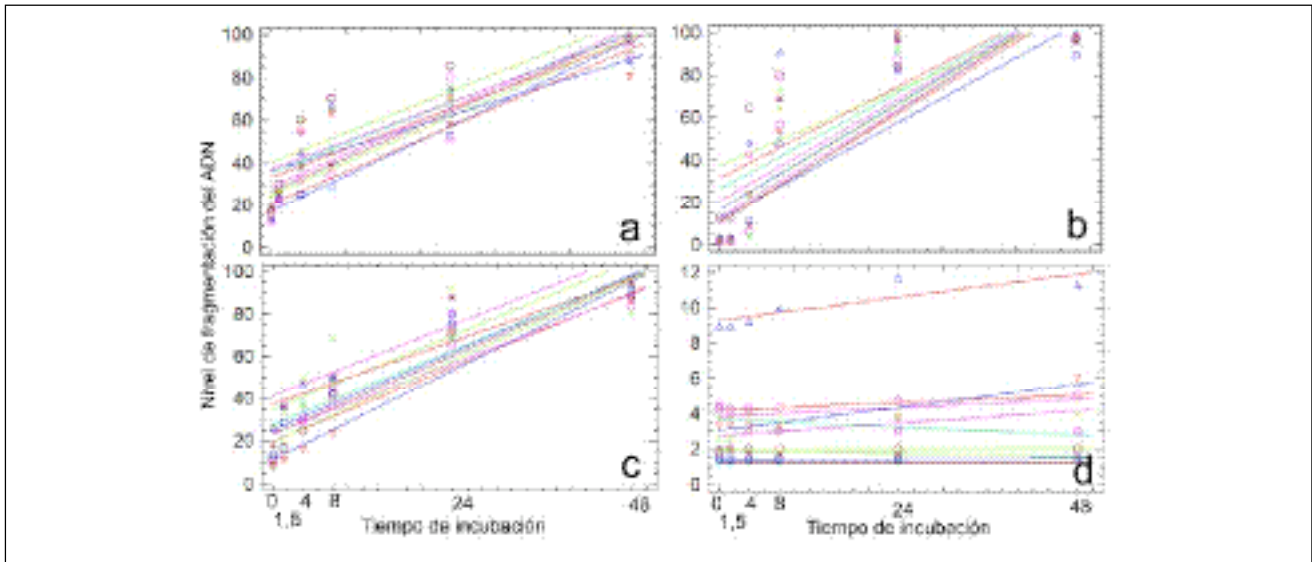


Figura 4

Análisis de regresión de los valores mostrados en la figura 3. Humano (a) morueco (b), caballo (c) y toro (d). Ver tabla 1 y texto para información de residuos

al morueco (Tabla 1), mientras que en el caso del toro, el disparo real de la fragmentación ocurre de manera efectiva, por lo menos transcurridas 48 horas post descongelación-incubación. Al igual que en el caso de los humanos, se encontraron diferentes pendientes para cada individuo, lo que demostraba que la dinámica de la fragmentación era distinta para cada individuo dentro de la misma especie.

Tabla 1

Valores de R² para las correlaciones entre los niveles de fragmentación y el tiempo (T0 y T48) en las diferentes especies estudiadas. EAR: Error absoluto de los residuos. En la última columna (V4) se recogen los datos de velocidad media de fragmentación del ADN espermático por unidad de tiempo, estimada para cada especie durante las primeras 4 horas de incubación de las muestras de espermatozoides a 37°C

| | R ² | p | EAR | V4 |
|---------|----------------|------|-------|------|
| Humano | 83,1% | 0,01 | 9,08 | 7,4 |
| Morueco | 70,4% | 0,01 | 20,31 | 15,7 |
| Caballo | 87,2% | 0,01 | 8,70 | 5,7 |
| Toro | 98,8% | 0,01 | 0,15 | 0 |

El análisis de regresión mostraba unos ajustes aceptables en las distintas especies. Al igual que ocurre en el caso de los humanos, el incremento de los niveles de fragmentación se correlaciona con el tiempo.

Sin embargo, el error para los residuos era en algunos casos, muy elevado como por ejemplo en el caso del morueco (Tabla 1). Esto podría ser indicativo de que las tendencias hacia el incremento de la fragmentación podría ser distinta entre especies. Para comprobar este aspecto particular, se realizó un ajuste de la tendencia hacia el incremento de los niveles de fragmentación de cada especie utilizando los valores medios obtenidos para los 10 individuos en cada punto de análisis. En la Figura 5 se muestran el ajuste de la curva y los valores de R² obtenidos. En el caso de humanos, los valores de R² mayores se obtuvieron utilizando un ajuste a una curva de tendencia exponencial (Figura 5a), mientras que en el caso del morueco la tendencia era de tipo logarítmico. En el caso del caballo y del toro, si bien con diferentes pendientes como vimos en el análisis posterior, se obtuvieron unos valores altos de R² para una un ajuste de tendencia lineal (Figura 5 b, d). Si bien esta es la tendencia general de ajuste para cada una de las especies, si analizáramos cada individuo por separado encontraríamos que los valores de R² son variables para cada individuo, lo que está en consonancia con los cruces de las pendientes observadas para cada individuo tras el análisis de regresión.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente experimento indican que la fragmentación del ADN puede

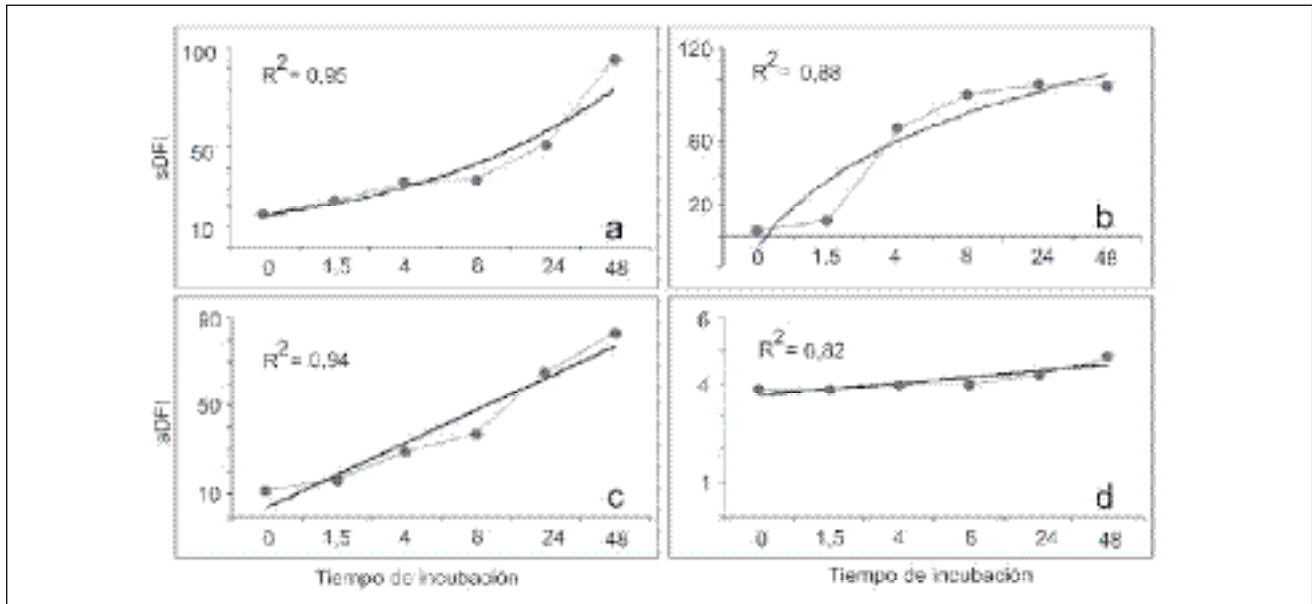


Figura 5

Mejor ajuste conseguido en las distintas especies analizadas. Humano (a), morueco (b), caballo (c) y toro (d). Mientras que la tendencia hacia el incremento en los niveles de fragmentación es de tipo exponencial en el caso de los humanos, esta es de tipo logarítmico en el caso del morueco

ser un efecto importante de la rápida disminución en la calidad seminal, dado que la molécula de ADN tiende a degradarse de forma rápida tras la descongelación. Sin embargo, la velocidad de degradación de la molécula de ADN varía entre las especies, siendo muy elevada para el caso de oveja, media para el caso del humano y el caballo y baja en el caso del toro.

En la práctica, las condiciones experimentales utilizadas en este experimento, sobre todo en el caso de los espermatozoides humanos, son idénticas a las que se utilizan para FIV. Dado que se trata de donantes con una calidad seminal seleccionada, es evidente que incluso en estos casos parece aconsejable una utilización rápida de las muestras una vez descongeladas dado que la degradación del ADN parece que se inicia rápidamente tras la incubación a 37°C, con lo cual cualquier ligero retraso podría ejercer una influencia negativa sobre la fertilidad de ese donante. En el caso de los humanos, debido a la velocidad de degradación observada durante las primeras 4 horas de incubación, parece muy probable que cualquier muestra pueda llegar a presentar casi un 50% de las células espermáticas con su ADN dañado transcurridas las primeras horas de incubación. Si relacionamos estos niveles de fragmentación con las ventanas definidas como asumibles para los niveles de fragmentación en el caso de

humanos, donde se considera que individuos que presentaran niveles mayores de 30% de fragmentación podrían tener mayores dificultades para conseguir embarazo (23), o bien aquellos que superan un 20% podrían estar fuera de la norma (24), es evidente que la muestras de semen que se utilizan para inseminación artificial, transcurridos una serie de minutos, pueden haber superado con creces estos valores.

La pérdida de la calidad del espermatozoides cuando las muestra se exponen a un aumento de la temperatura que se considera biológicamente correcta, se ha descrito en la mayoría de los animales analizados. Por ejemplo, la fertilidad del espermatozoides de toro se conserva con unas tasas aceptables durante los 3-5 días, si el semen se almacena a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la fertilidad disminuye a una tasa del 3%-6% por día y esto ocurre incluso cuando el espermatozoides se almacena a 5°C. Sin embargo, este efecto es mayor cuando la temperatura de incubación es de 15°C (25). En el caso del toro, este resultado concuerda perfectamente con la baja velocidad de fragmentación del ADN que presenta esta especie, demostrada en nuestro estudio. De igual forma, en el caso de la oveja, es bien conocido que la inseminación utilizando muestras de semen congelado ofrece malos resultados (26, 27), lo también estaría de acuerdo con la

presencia de un aumento rápido en los niveles de fragmentación y de un ajuste muy alto a un modelo de incremento de tipo logarítmico. En el caso de las ovejas, el resultado de una buena fertilidad tras inseminación artificial se complica por la estructura compleja del cuello uterino.

En humanos, los estudios de dinámica de fragmentación del ADN son prácticamente inexistentes, pero se ha demostrado que la recogida de semen eyaculado en áreas geográficas distantes y fuera de los laboratorios donde se realiza la inseminación artificial, podría dar lugar a un incremento en los espermatozoides con daño en el ADN (28). Las consecuencias de la corta longevidad de la calidad del espermatozoides detectada en determinadas situaciones clínicas podrían también estar relacionadas con el efecto descrito en el presente estudio. Es posible que en situaciones clínicas de riesgo para la calidad seminal, estos efectos puedan estar amplificados, por un proceso de degradación en cadena. De hecho, se ha demostrado que la fragmentación del ADN en individuos con azoospermia obstructiva se incrementa cuatro veces transcurridas 24 horas desde la eyaculación (29). Así, en estas circunstancias, el uso inmediato de espermatozoides testiculares en la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es altamente recomendable (29).

Nuestros resultados sugieren que se debe prestar especial atención al factor temporal en el análisis seminal. Es posible que ciertas características consideradas como suficientes para la fertilización en el inicio de la evaluación de la calidad del espermatozoide puedan cambiar rápidamente entre la inseminación y la fertilización. Además, nuestros estudios han demostrado una variabilidad interindividual en la dinámica de la fragmentación del ADN del espermatozoide. Es decir, no todos los individuos presentan la misma tasa de incremento de la fragmentación en su ADN, hecho que se había encontrado en otras especies (30, 31). Este comportamiento sugiere una hipótesis interesante para verificar, esto es, las personas cuyas muestras seminales presentan un aumento exponencial (velocidad lenta inicial) de la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado tendrían mayor aptitud reproductiva que las que muestran un incremento logarítmico (velocidad rápida inicial). Si esto es cierto, el diseño experimental aquí expuesto se podría utilizar para seleccionar las muestras seminales de aquellos donantes con mayor estabilidad del ADN a largo plazo, para ser empleadas en la inseminación artificial. En cualquier caso, parece evidente e imprescindible para cualquier clínica, que las muestras seminales se utilicen lo más rápidamente posible una vez que hayan sido descongeladas.

Por último, el momento temporal de determinación de sDF debe especificarse en cada determinación, ya que esto podría ser una limitación para establecer comparaciones fiables entre las técnicas para evaluar la sDF y entre los resultados obtenidos en distintos laboratorios. Sin ninguna referencia explícita a la hora de recogida del semen y de descongelación de la pajuela, así como las condiciones de almacenamiento y manipulación, las comparaciones de resultados de sDF entre diferentes laboratorios, o correlaciones del sDFI con la fertilización, calidad embrionaria y embarazo, podría carecer de sentido o por lo menos siempre podrían ser discutibles. Quizás para un futuro, que no debiera ser muy lejano, sí que se deberían protocolizar tanto las normas para las tomas de muestras, como los tiempos transcurridos entre las tomas de esas muestras y la realización de los análisis. Esto ayudaría de forma muy notoria a entender muchas de las discrepancias que ahora encontramos entre los resultados que presentan distintos grupos sobre algunos de los aspectos que hemos tratado en este trabajo. En nuestro caso, tanto en humanos como en otros mamíferos, en el caso de muestras seminales frescas realizamos los análisis tras dilución de la muestra. Esta dilución siempre se realiza, si ello es posible, inmediatamente tras la obtención de la muestra. De no ser posible por aspectos de logística, siempre se hace referencia a los tiempos y condiciones de almacenamiento de la muestra hasta su análisis. Esto nos permite que en situaciones en las que detectamos una baja calidad seminal y estas se asocian a no haber seguido el protocolo preestablecido, se podría rediseñar la toma de muestra y adaptarla a protocolo para descartar o aceptar que el manejo de la muestra tiene una baja influencia en el resultado final.

En conclusión, los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran de forma evidente que la determinación de la frecuencia de espermatozoides con ADN fragmentado debiera ser considerada y evaluada como parte de un proceso dinámico y no estático. Esto no sólo es así en el caso de humanos, sino que también compete, como era lógico de esperar, a otras especies de mamíferos. Por lo tanto, los valores que podamos atribuirle a los niveles de fragmentación del ADN en un individuo, tienen un sentido relativo y no comparable con los de otro individuo si no se explicitan en que condiciones y cuando se ha realizado el estudio de esa muestra.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a los técnicos F Aroyo y A Gosálbez su activa colaboración en la ob-

tención de muchos de los datos presentados en este estudio y a Halotech DNA por su ayuda técnica. Estudio realizado con fondos de investigación públicos BFU 2007-66340/BFI, CCG06-UAM/AGR-0307, Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, México y Xunta de Galicia INCITE07PXI916201ES.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Agarwal A, Bragais FM, Sabanegh E.:** Assessing Sperm Function.: *Urol Clin N Am.* 2008; 35: 157-171.
2. **Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Steinkampf MP.:** Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril.* 1998; 70: 207-213.
3. **McLachlan RI, Baker HW, Clarke GN, Harrison KL, Matson PL, Holden CA, de Kretser DM.:** Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. *Pathology.* 2003; 35: 25-33.
4. **Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J.:** Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urol Esp.* 2007; 31: 120-131.
5. **Agarwal A, Allamaneni SSR.:** Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Rev Int Androl.* 2005; 3: 31-37.
6. **Zini A, Bielecki R, Phang D and Zenzes MT.:** Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 2001; 75: 674-677.
7. **Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings, Z, Irvine DS.:** Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1998; 59: 1037-1046.
8. **Agarwal A, Allamaneni SSR.:** Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2004; 9: 338-347.
9. **Tomlinson MJ, Turner J, Powell G, Sakkas D.:** One-step disposable chambers for sperm concentration and motility assessment: how do they compare with the World Health Organisation's methods? *Hum Reprod.* 2001; 16: 121-124.
10. **Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreiss J.:** Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl.* 2002; 23: 717-23.
11. **Brinkworth MH.:** Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *Int J Androl.* 2000; 23: 123-35.
12. **Perreault SD.:** Distinguishing between fertilization failure and early pregnancy loss when identifying male-mediated adverse pregnancy outcomes. *Adv Exp Med Biol* 2003; 518: 189-98.
13. **Aitken RJ, Krausz C.:** Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 2001; 122: 497-506.
14. **Silber SJ, Repping S.:** Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome. *Hum Reprod Update.* 2002; 8: 217-29.
15. **Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, GaoYT, Ying DM, Jin F.:** Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89: 238-243.
16. **Cox GE, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling, Wu BL, Horsthemke B.:** Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 162-4.
17. **Fernández 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: 59-66.
18. **Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, Lafromboise M, De Jonge C.:** Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril.* 2005; 84: 833-842.
19. **Enciso M, Muriel L, Fernandez JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejo JM, Ardoy M, Pacheco A, Gosálvez J.:** Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl.* 2006; 27: 106-111.
20. **Enciso M, López-Fernández C, Fernández JL, García P, Gosálvez J.:** A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology.* 2006; 65: 308-316.
21. **López-Fernández C, Crespo F, Arrollo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD, Gosálvez J.:** Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II: the stallion *Theriogenology.* 2007; 68: 1240-1250.
22. **Cortés-Gutiérrez EI, Crespo F, Gosálvez A, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Gósalvez J.:** DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leonés, a breed at risk of extinction. *Theriogenology.* 2008; 69: 1022-1032.
23. **Evenson DP, Wixon R.:** Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 2006; 15: 979-991.
24. **Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidans J, Giwercman A.:** Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod.* 2006; 21: 2061-2064.

25. **Vishwanath R, Shannon P.:** Do sperm cells age?. A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperatures. *Reprod Fertil Dev.* 1997; 9: 321-31.
26. **Windsor DP, Szell AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JT, Buckrell BC.:** Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology.* 1994; 42: 147-57.
27. **Donovan A, Hanrahan JP, Kummer E, Duffy P, Boland MP.:** Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Anim Reprod Sci.* 2004; 84: 359-68.
28. **Young KE, Robbins WA, Xun L, Elashoff D, Rothmann, Perreault SD.:** Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. *J Androl.* 2003; 24: 853-861.
29. **Young KE, Robbins WA, Xun L, Elashoff D, Rothmann, Perreault SD.:** Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. *J Androl* 2003; 24: 853-861.
30. **Pérez-Llano B, Enciso M, García-Casado P, Sala R, Gosálvez J.:** Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology.* 2006; 66: 2137-2143.
31. **Gosálvez J, Fernández JL, Gosálbez A, Arrollo A, Agarwal A, López-Fernández.:** Dynamics of sperm DNA fragmentation in mammalian species as assessed by the SCD methodology. *Fertil Steril.* 2007; 88: S365-S365.