



ESTADO ACTUAL DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Sergio Gómez Vera
Farmacéutico Interno Residente Análisis Clínicos
Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz

INTRODUCCIÓN

- Infertilidad humana: 15-20 % de parejas, (40% hombre, 40% mujer)
- Estudio de la infertilidad masculina: seminograma es la mejor herramienta diagnóstica:
 - Estudio macroscópico.
 - Estudio microscópico: concentración, morfología, vitalidad, etcetera.
 - No detecta daños a nivel genómico.

INTRODUCCIÓN

- La fertilidad del hombre está relacionada con la integridad del ADN espermático, tanto para el proceso de fecundación, como para el desarrollo embrionario.
- Pérdida de integridad = fragmentación
- Objetivo de estudiar la fragmentación:
 - Disminuirla con tratamientos.
 - Selección de espermatozoides.

INTRODUCCIÓN

- La fragmentación no es un concepto nuevo, se remonta a la década de 1940.
- Se siguen publicando numerosos artículos.
- Los resultados no son totalmente concluyentes, hay controversia en cuanto a la técnica a utilizar y si la aplicación de estas técnicas mejoran los resultados en la reproducción asistida.
- Evaluación de la fragmentación tiene un alto valor predictivo, para el éxito de la fecundación in vivo.

INTRODUCCIÓN

2006: American Society for Reproductive Medicine (ASRM)
«Actualmente los métodos para evaluar la integridad del ADN espermático no predicen de manera confiable los resultados en los tratamientos de reproducción asistida, y ningún tratamiento para reducir la fragmentación ha demostrado valor clínico”.

INTRODUCCIÓN

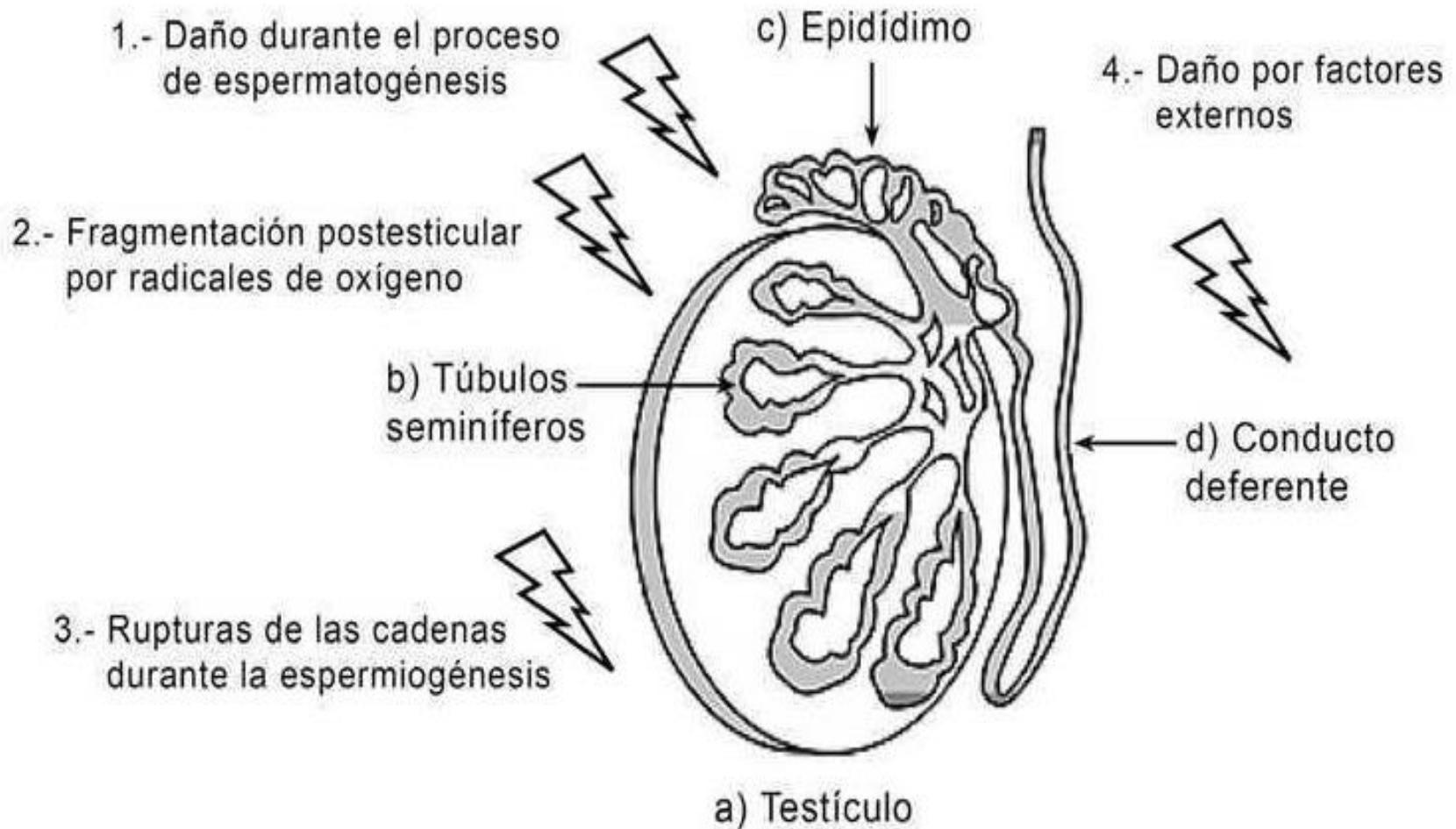
2010: European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)

“ si bien, la fragmentación del ADN espermático puede tener un efecto importante, y por lo tanto mayor utilidad clínica, en las tasas de embarazo por inseminación artificial y en la pérdida del embarazo después de la FIV y la ICSI, son necesarios estudios prospectivos más grandes, con un diseño y control adecuado, para confirmar estos resultados”.

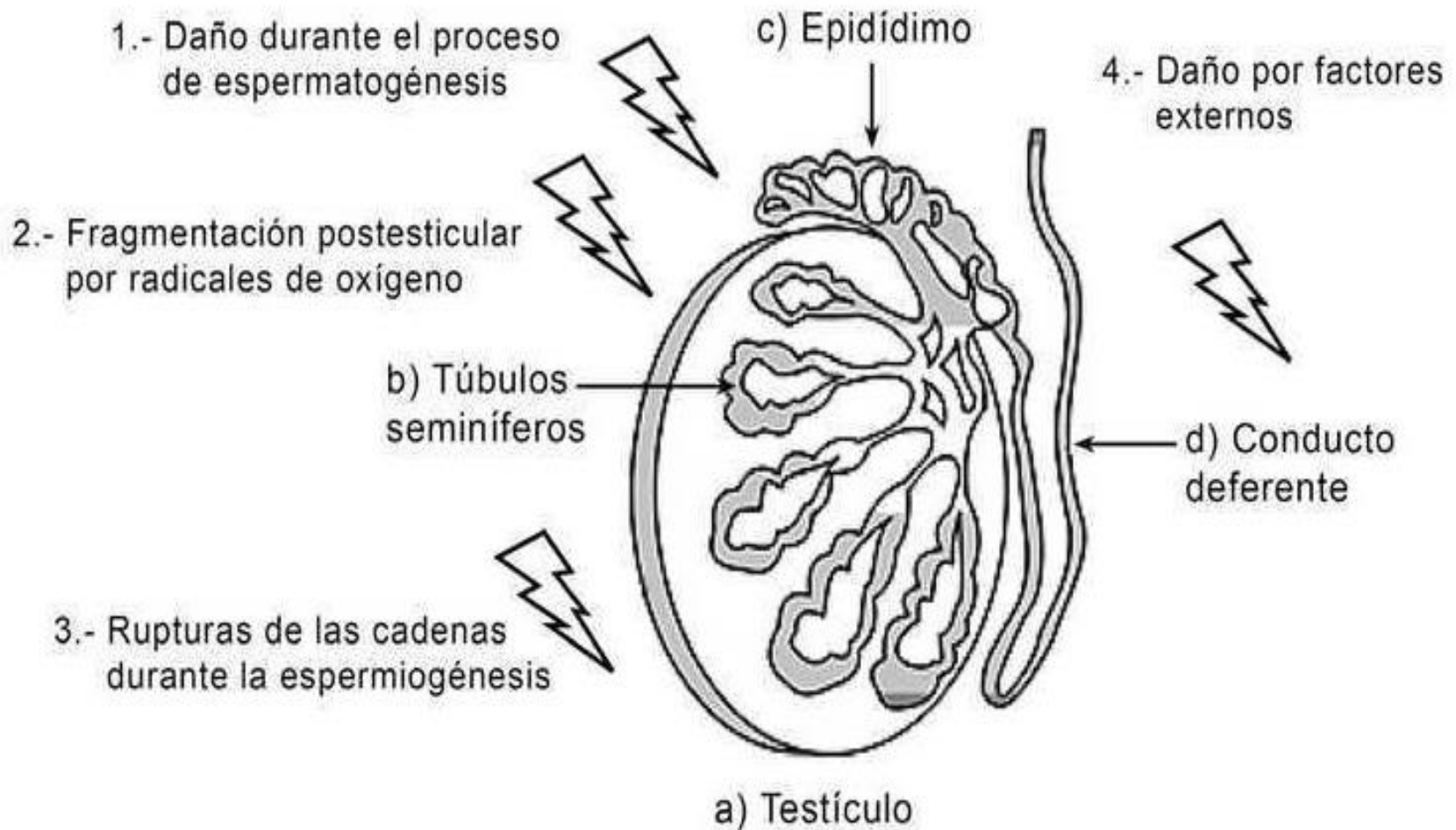
INTRODUCCIÓN

Las principales sociedades científicas no recomiendan su uso rutinario para el estudio de la fertilidad masculina, dada la baja correlación con los resultados en reproducción asistida y la variabilidad de los resultados.

FISIOPATOGENIA



El daño en el material genético espermático se puede producir en cualquier etapa del proceso de la espermatogénesis y es multifactorial



FISIOPATOGENIA

- Daños oxidativos, radicales libres de oxígeno.
- Daños en el enlace fosfodiester, glucosídico, pérdida de grupos amino...
- Rotura de cadena sencilla o doble.
- Afectación extensiva o localizada.

FISIOPATOGENIA

- Daños oxidativos, radicales libres de oxígeno.
- Daños en el enlace fosfodiester, glucosídico, pérdida de grupos amino...
- Rotura de cadena sencilla o doble.
- Afectación extensiva o localizada.

El ovocito tiene capacidad de reparar parte del daño, en función del grado (reparable si es de cadena sencilla) y de la calidad ovocitaria que se ve afectada con la edad de la mujer

FISIOPATOGENIA

- Contaminación.
- Hábitos de vida: tabaquismo, alcohol.
- Exposición a sustancias gonadotóxicas, principalmente:
 - Resinas
 - Metales pesados.
 - Insecticidas.
 - Pesticidas
- Temperatura testicular elevada.
- Quimioterapia o radioterapia.

FISIOPATOGENIA

- Criptorquidia.
- Varicocele.
- Leucocitospermia
- Procesos inflamatorios.
- Infección del tracto genital masculino.
- Cáncer.
- Episodios febriles.
- Factores genéticos.

CUANTIFICACIÓN DAÑO ADN ESPERMÁTICO

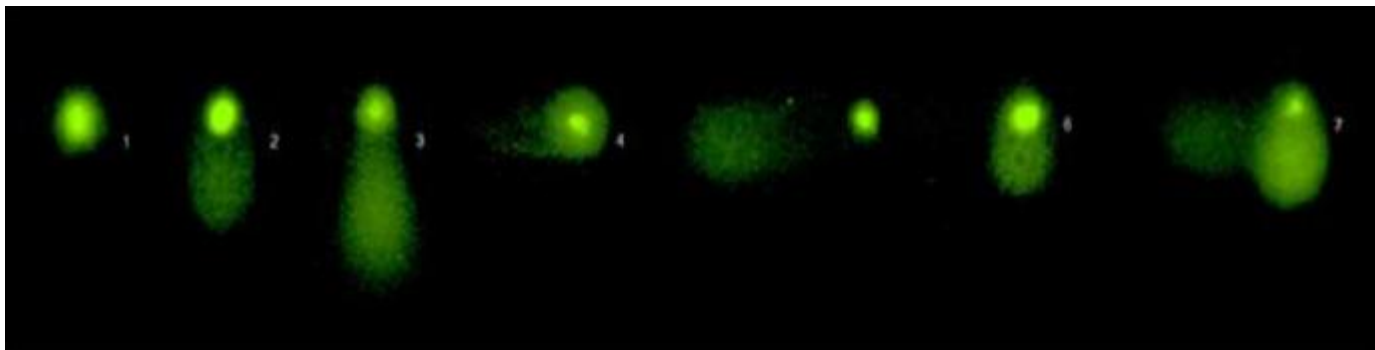
- ☐ Ensayo COMETA.
- ☐ Test de la estructura de la cromatina espermática (SCSA).
- ☐ Marcado de extremos libres por d-UTP (TUNEL)
- ☐ Ensayo de dispersión de la cromatina (SCD).

ENSAYO COMETA O ELECTROFORESIS EN GEL DE CÉLULAS INDIVIDUALES (SCGE)

- Gel de agarosa sobre un portaobjetos y se someten a lisis con un agente reductor de las protaminas, permitiendo que el ADN fragmentado migre por electroforesis y se tiñe con sustancias fluorescentes.
- Fragmentos de ADN salen de la cabeza del espermatozoide y se asemeja a la cola de un "cometa".
- Intensidad y la longitud de la cola del cometa representa la cantidad de ADN migrado, indicando diferentes grados de fragmentación.

ENSAYO COMETA O ELECTROFORESIS EN GEL DE CÉLULAS INDIVIDUALES (SCGE)

- Se requieren alrededor de 5000 espermatozoides, siendo interesante en muestras de biopsia testicular.
- Detecta daño si el daño es de cadena sencilla o doble, realizando dos electroforesis secuenciales, una en condiciones neutras (doble cadena) y en condiciones alcalinas (cadena sencilla).
- Es laborioso y complejo.



TEST DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA).

- Evalúa la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización con condiciones ácidas o por medio de calor, y posteriormente se tiñe con naranja de acridina. ADN fragmentado es más susceptible a ser desnaturalizado
- Verde cuando se intercala en ADN bicatenario (intacto)
- Roja si la hebra es sencilla (ADN desnaturalizado).
- Citometría de flujo (coste), puede evaluar grandes cantidades de células (10000 células) de forma rápida y fiable
- Umbral clínico establecido del 30%.

MARCADO DE EXTREMOS LIBRES POR D-UTP (TUNEL)

- Terminal dUTP Nick-End Labeling
- Nucleótidos marcados (d-UTP) con fluorescencia en los puntos de rotura 3OH libres
- Análisis por microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo, obteniéndose mayor fluorescencia cuanto mayor es el número de roturas del ADN.
- Valor de referencia entre el 15 y el 20 %.
- Técnica con mayor correlación con los resultados de la reproducción asistida, comercializada y los resultados son fáciles de interpretar.

ENSAYO DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD).

- Descondensación de la cromatina tras tratamiento ácido seguido de desproteinización nuclear
- Descondensación normal (halo grande de dispersión de los bucles de ADN, equivalente a la ausencia de ADN fragmentado)
- Descondensación menor (halo pequeño o incluso sin halo, que equivaldría a un ADN espermático fragmentado).
- Se valora el tamaño del halo de dispersión mediante microscopía de campo claro.
- Comercializada (Halosperm) y puede ser realizada de forma sencilla en cualquier laboratorio de Andrología.

ENSAYO DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD).

Materiales:

- Agarosa de bajo punto de fusión.
- Portas pretratados con agarosa.
- Agente desnaturalizante = Solución 1
- Solución de lisis = Solución 2
- Reactivo para tinción de eosina = Solución 3
- Reactivo para tinción tiamina = Solución 4
- No incluidos en el kit:
 - Alcohol 70°
 - Alcohol 100°
 - Agua destilada.

ENSAYO DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD).

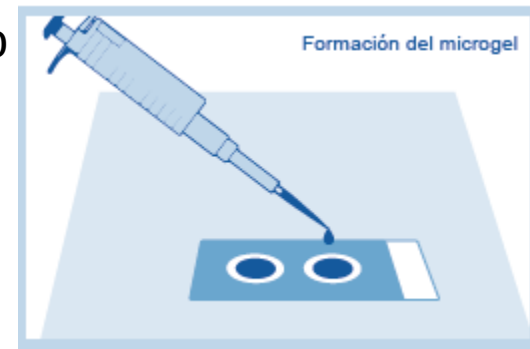
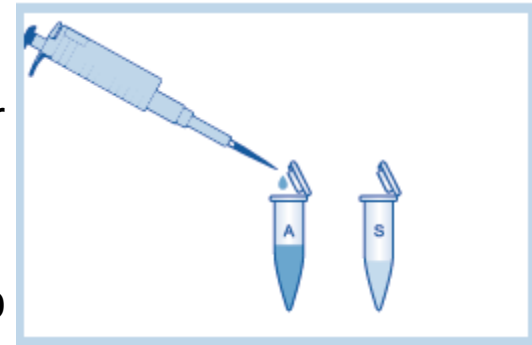
Muestra:

- Semen recogido mediante masturbación en frasco estéril de boca ancha, tras un periodo de abstinencia de 2-3 días.
- Se puede realizar con semen fresco, muestra capacitada mediante swim up o gradiente de densidad, congelada a -20°C (estable 1mes) ó criopreservada a -180°C (estable varios años).
- Realizar el REM de la muestra y diluir hasta un máximo de 20 millones/mL si fuese necesario.

ENSAYO DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD).

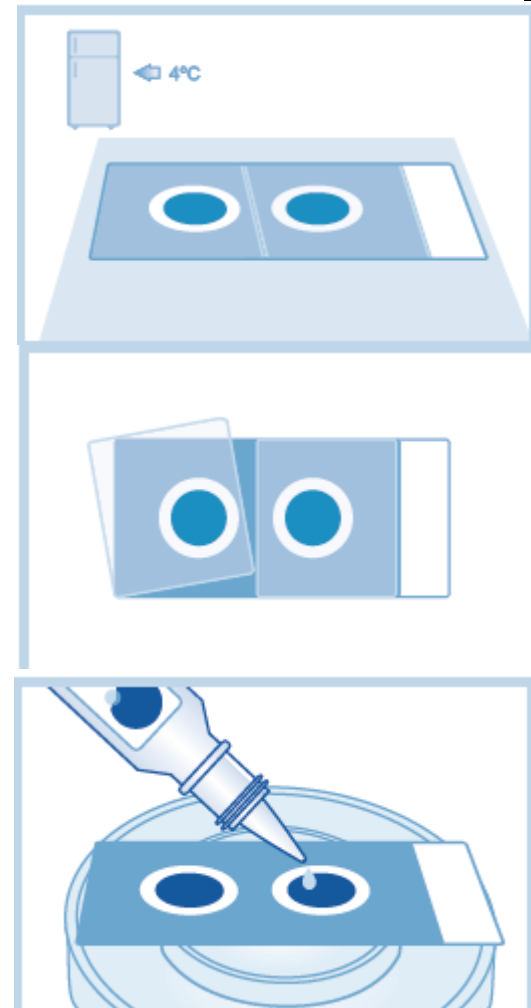
Procedimiento de análisis:

- Licuar al baño maría 95-100°C, un eppendorf con 100 μ L de agarosa, por cada muestra de semen.
- Añadir 50 μ L muestra al eppendorf. Homogeneizar evitando la formación de burbujas.
- Poner 8 μ L de la mezcla en el centro del pocillo destinado a la mezcla (S) y 8 μ L al pocillo (C) para realizar un control. Cubrir con cubreobjetos evitando formación de burbujas.



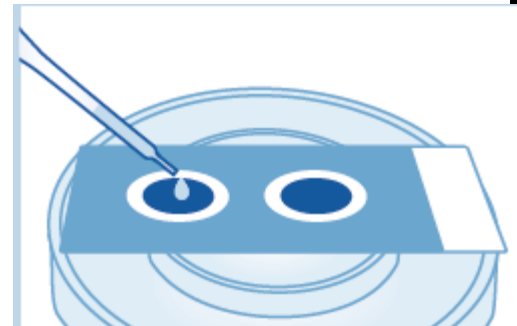
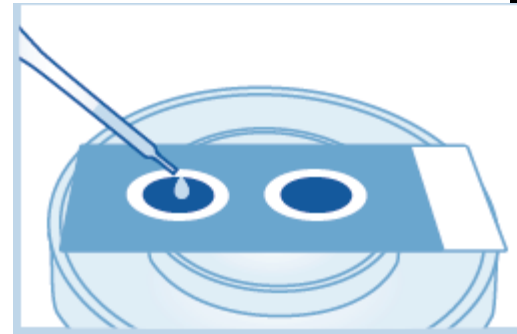
ENSAYO DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD).

- Colocar el porta en posición horizontal sobre una superficie fría (placa de cristal ó metal previamente enfriada en el frigorífico), 4°C durante 5 minutos para su gelificación.
- Sacar del frigorífico y retirar el cubreobjetos deslizándolo cuidadosamente.
- Con el porta horizontal y apoyado en una placa petri, cubrir el pocillo con la Solución 1 e incubar 7 minutos. ***Para control positivo de la muestra NO añadir este reactivo.***



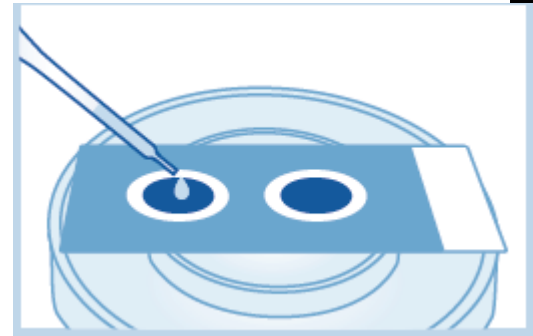
ENSAYO DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD).

- Retirar la solución volcando ligeramente el porta
- Cubrir los pocillos con la Solución 2 e incubar 20 minutos. ***Para control negativo de la muestra NO añadir este reactivo.***
- Retirar la solución volcando ligeramente el porta
- Lavar con abundante agua destilada, durante 5 minutos, ayudándonos de pipeta desechable.
- Retirar la solución volcando ligeramente el porta.
- Deshidratar con Alcohol de 70°, usando pipeta desechable, durante 2 minutos.
- Retirar la solución volcando ligeramente el porta.



ENSAYO DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD).

- Deshidratar con Alcohol de 100°, usando pipeta desechable, durante 2 minutos.
- Retirar la solución volcando ligeramente el porta.
- Dejar secar en posición horizontal.
- Tinción:
 - Cubrir con la Solución 3, incubar 7 minutos.
 - Retirar la solución volcando ligeramente el porta.
 - Cubrir con la Solución 4, incubar 7 minutos.
 - Retirar la solución volcando ligeramente el porta. Dejar secar a T^a ambiente.



ENSAYO DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD).

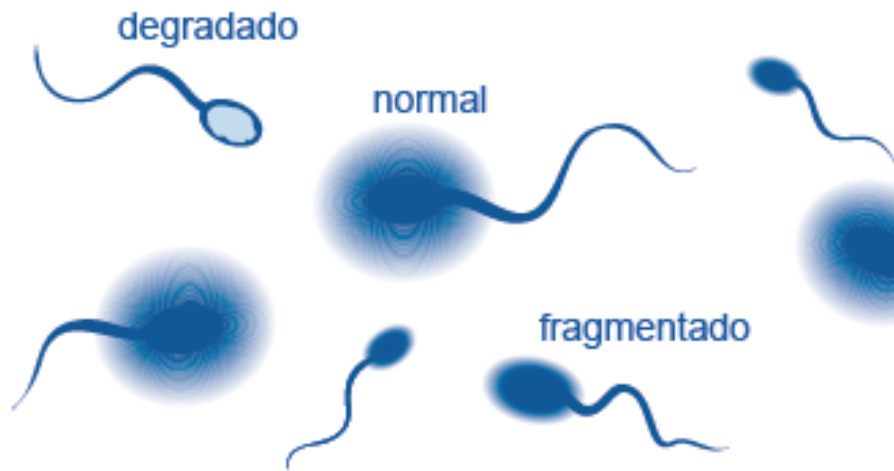
Microscopía de campo claro, 40x, contar un mínimo de 300 espermatozoides :

- **Espermatozoides con DNA fragmentado:**
 - Espermatozoides con halo pequeño (anchura halo $\leq 1/3$ del diámetro del núcleo)
 - Espermatozoides sin halo y degradados
- **Espermatozoides sin DNA fragmentado:**
 - Espermatozoides con halo grande (anchura del halo $\geq$ al diámetro del núcleo)
 - Espermatozoides con halo intermedio



1. Halo grande | 2. Halo medio | 3. Halo pequeño | 4. Sin halo | 5. Degradado

ENSAYO DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD).



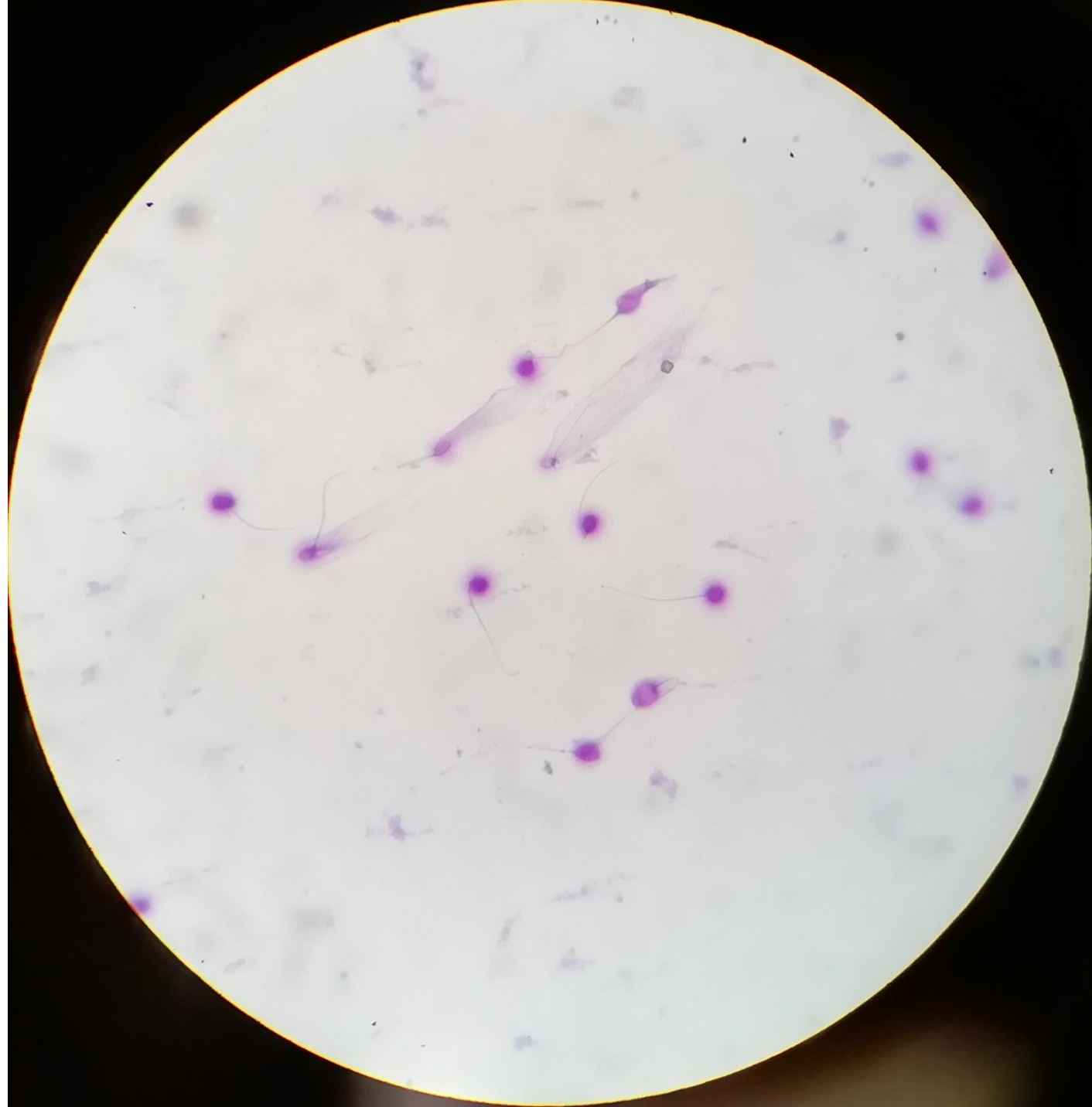
$$\text{SDF (\%)} = \frac{\text{Fragmentado + degradado}}{\text{Total de células cuantificadas}} \times 100$$

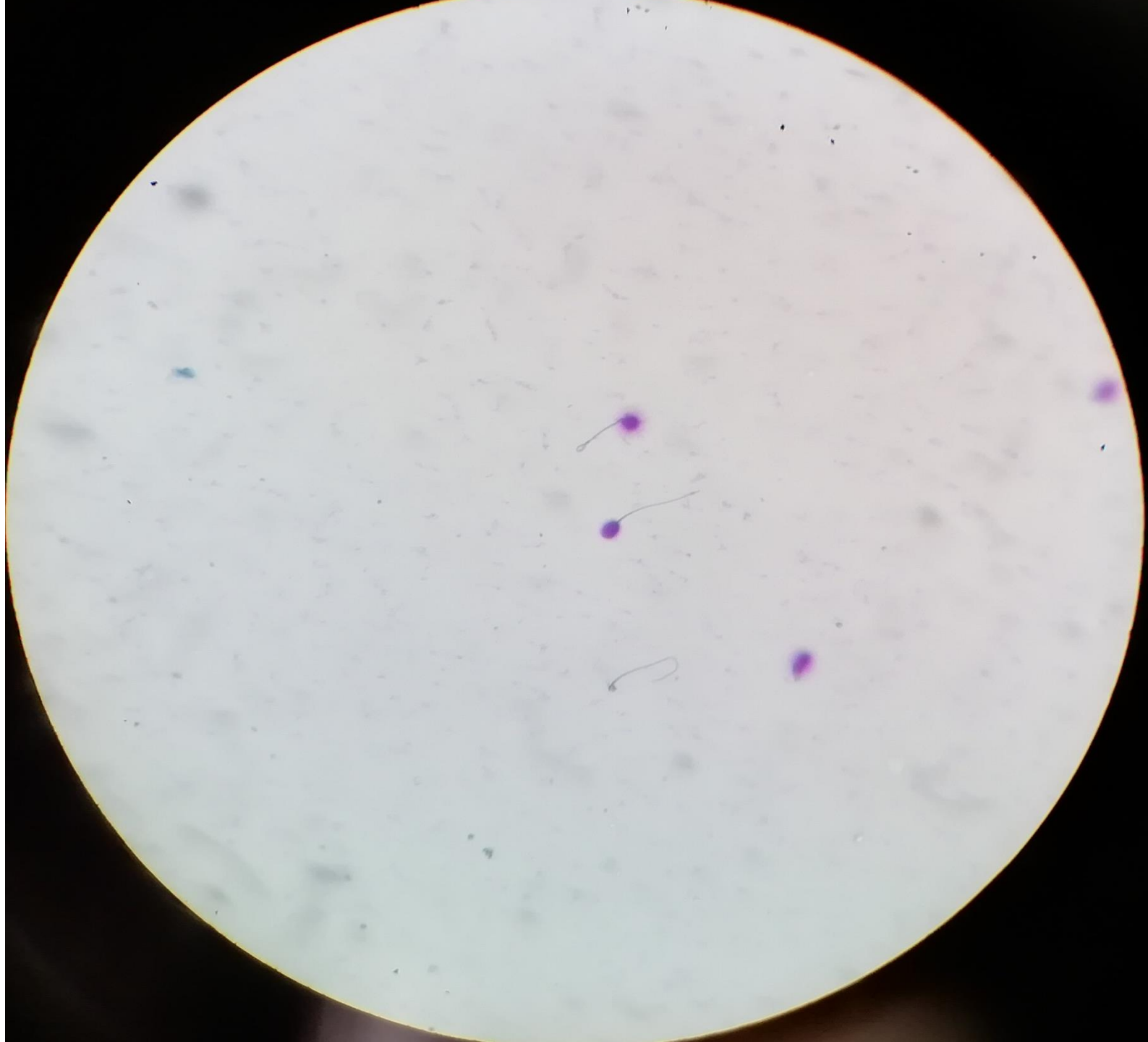
Se estima un resultado normal cuando los spz fragmentados no superan el 25 %.

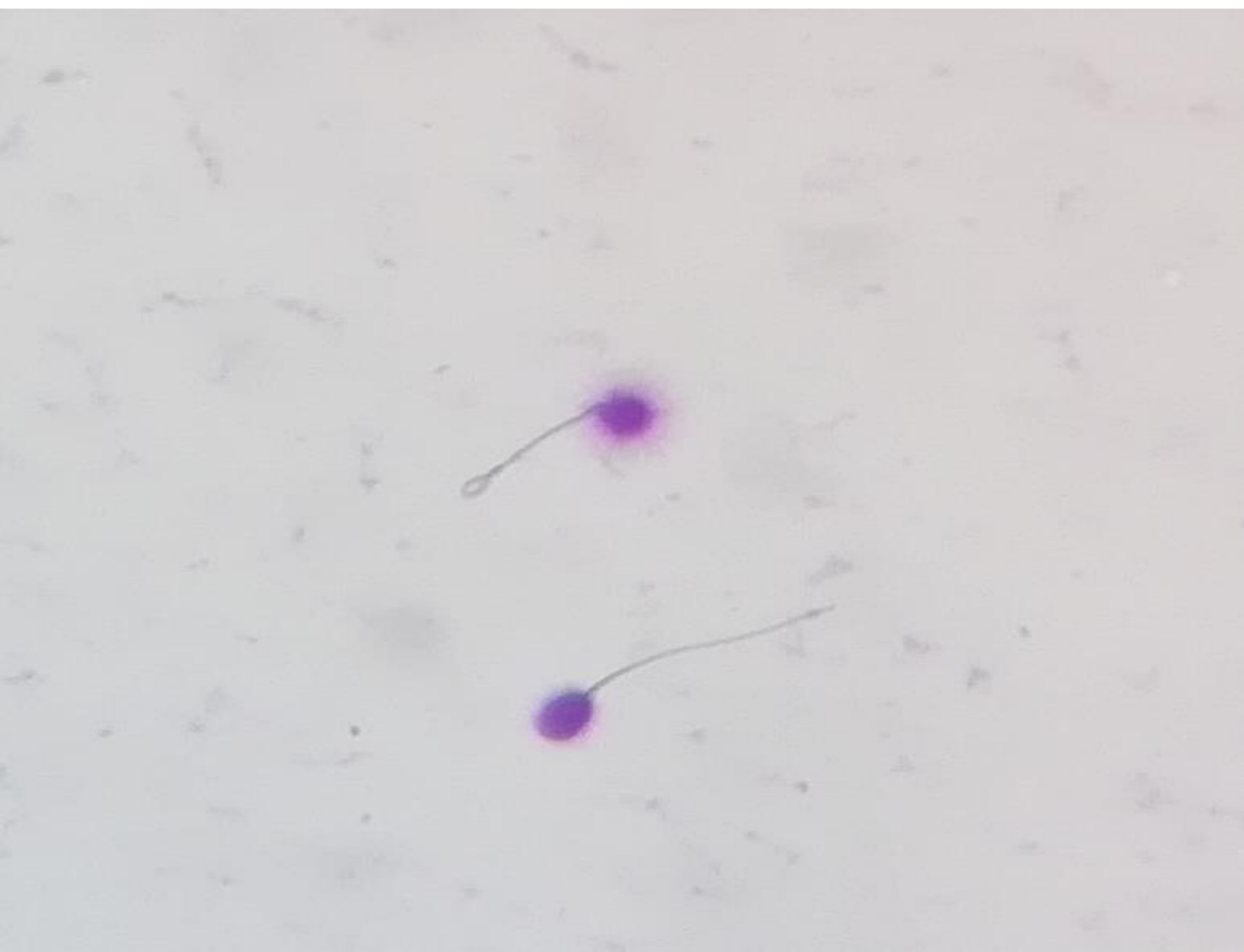
En los estudios donde se relaciona la fragmentación y el potencial fertilizante, un índice de fragmentación espermático:

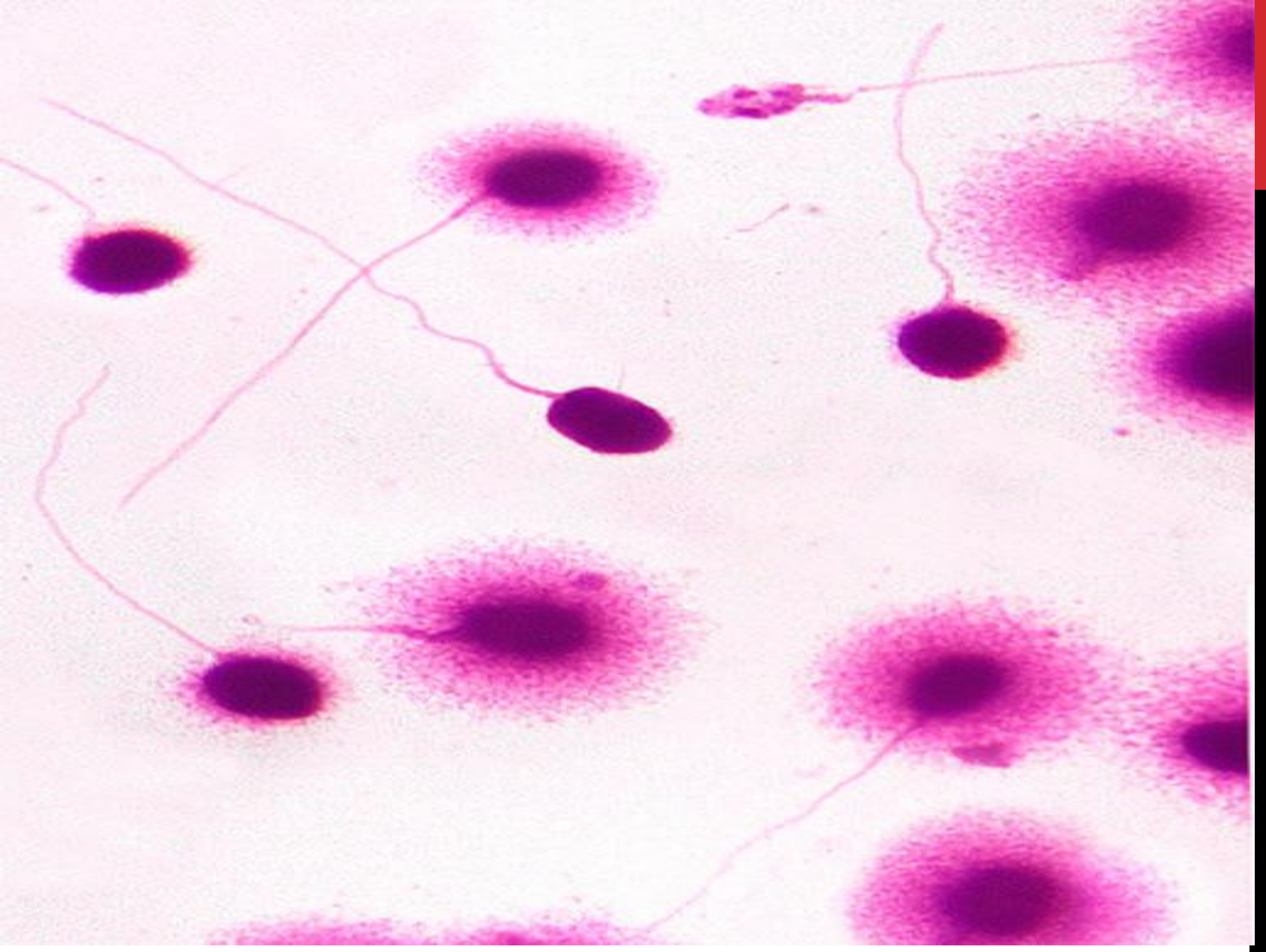
- <15 % tienen un excelente potencial.
- Del 15-24 % tiene un alto potencial.
- Del 25-30% tiene bajo potencial.
- Del 30-40 % tiene muy bajo potencial.

Se considera que existe incompatibilidad con la fertilidad in vivo en casos en donde es mayor del 40 %









DISMINUCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN

- Terapia antioxidante oral:
 - Dieta rica en vitamina C, vitamina E, selenio, zinc, etcétera.
 - Suplementos alimentarios.
 - Diseño de los distintos estudios, composición de los suplementos...
difieren unos de otros, resultados variables y no concluyentes.

DISMINUCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN

- Eyaculaciones recurrentes (de forma aislada o combinadas con técnicas de selección de espermatozoides).
 - Al reducir el periodo de abstinencia a 1-2 días, se reduce el tiempo que los espermatozoides se almacenan en el tracto reproductor masculino disminuyendo la exposición a distintos factores que producen la fragmentación.
 - En un estudio realizado en 2011 evaluaron la relación entre la abstinencia sexual y la tasa de fragmentación, comparando la fragmentación tras 24 horas de abstinencia y 3 horas, observándose un efecto mas marcado en la disminución de la tasa de fragmentación con una abstinencia de 3 horas

DISMINUCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN

- Recuperación de espermatozoides a partir de una biopsia testicular
Fragmentación ↓3-5 veces → apoya el uso de espermatozoides de biopsia para ICSI en pacientes con fragmentación alta .
- Detección y tratamiento de infecciones de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis*.
- Estudio y diagnóstico de varicocele, considerando una varicocelectomía

DISMINUCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN

- Selección de espermatozoides.
 - Clasificación celular activada magnética (MACS).
 - Fertile Chip

Separación magnética por columnas de Anexina: MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)

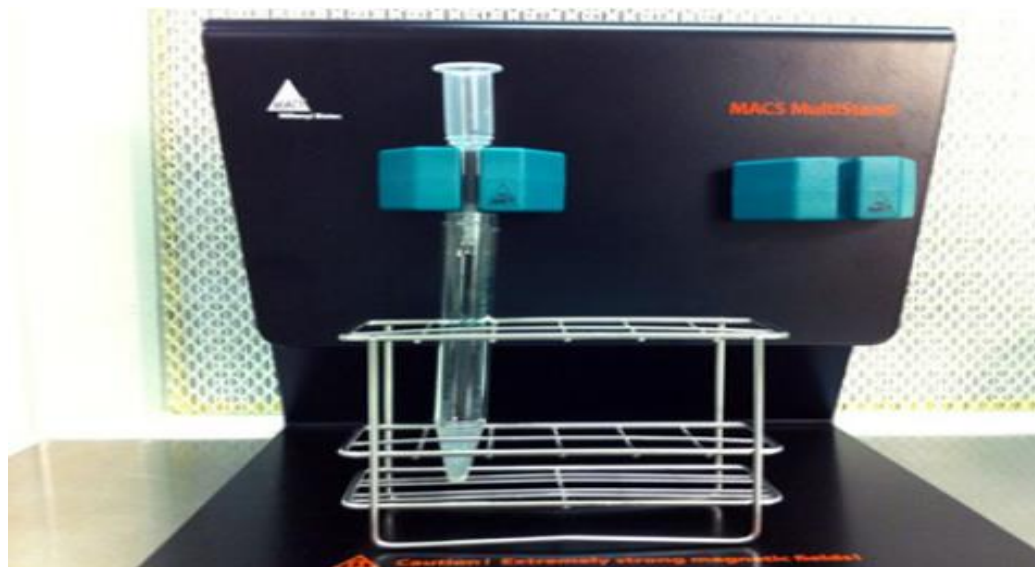
La calidad espermática es uno de los factores que ayuda a determinar el éxito de la reproducción asistida. Para una correcta fecundación se requiere que la membrana plasmática del espermatozoide tenga integridad y funcionalismo normal. Alteraciones de membrana se han relacionado con espermatozoides que han iniciado el proceso de apoptosis lo cual podría ser parcialmente responsable de las bajas tasas de fecundación e implantación encontradas en los correspondientes ciclos de reproducción asistida.

La separación magnética por columnas de Anexina V (MACS) es una técnica de selección que aplicada a muestras de semen nos permite eliminar espermatozoides apoptóticos del eyaculado, es decir, espermatozoides que han iniciado el ciclo de muerte celular programada.

Esto se consigue tras la incubación de la muestra de semen con Anexina V conjugada con esferas de hierro biodegradables y posteriormente hacerla pasar por una columna sometida a un campo magnético. Gracias a la Anexina V, proteína con elevada afinidad por la Fosfatidil serina (marcador apoptótico), los espermatozoides apoptóticos se unen a la Anexina V quedándose retenidos en la pared de la columna mientras que los no apoptóticos son recuperados por elución a la salida de esta.

La fracción de espermatozoides no apoptóticos es la utilizada en los tratamientos de reproducción asistida mejorando la capacidad fecundante del espermatozoide y con ello una mayor tasa de gestación.

Esta técnica se puede aplicar en aquellas parejas donde el varón presenta elevada fragmentación del ADN espermático.



Chips microfluídicos para la selección de espermatozoides

El chip FERTILE® es un sencillo e innovador dispositivo de selección de espermatozoides, que mediante la técnica de microfluidos, selecciona los espermatozoides más sanos para ICSI e FIV.

Esta técnica imita las condiciones del tracto vaginal femenino, que es un formidable seleccionador en cuanto al número e integridad de los espermatozoides que llegan hasta el ovocito.

Los espermatozoides seleccionados con FERTILE® muestran una mejor motilidad, morfología, bajas tasas de fragmentación de ADN y menor cantidad de especies óxido reactivas (ROS), que otros métodos tradicionales.



INDICACIONES

- Varicocele clínico: pacientes con varicocele grado 2/3 con parámetros seminales normales y con varicocele de grado 1 con resultados límites o anormales.

Causa más común de infertilidad primaria y secundaria en hombres → varicocelectomía mejora 60-80% parámetros del semen y una mejora del 20-60% en el embarazo natural.

Solo el 20% de los pacientes tienen dificultades para concebir, por ello la selección de pacientes para varicocelectomía mediante parámetros como la fragmentación ayudan a identificar quienes se beneficiarían más después de la cirugía.

INDICACIONES

- Infertilidad de causa desconocida con seminograma normal.
- Fallo en inseminación intrauterina.
- Pérdida de embarazo recurrente (tres pérdidas consecutivas < 20 semanas de gestación).
- Estos tres casos se asocian a ↑tasas de fragmentación
→ fragmentación se debe ofrecer a estas parejas, antes de iniciar inseminación o tras el fallo de la inseminación.

INDICACIONES

- Fallo de FIV y/ o ICSI.
 - Influye mas en la FIV, en contraposición de la ICSI que parece tener poca influencia.
 - Sin embargo, si que se correlaciona la fragmentación con la pérdida de embarazo tras tratamientos de FIV e ICSI; por ello, se indica la fragmentación en parejas sin éxito con estas TRA.
 - Espermatozoides de biopsia en lugar del semen eyaculado puede ser útil en pacientes con oligozoospermia, tasa de fragmentación↑ y fallo recurrente de FIV.
 - ↑tasa en pacientes con fallos de FIV puede indicar la aplicación temprana de ICSI con o sin el uso de espermatozoides de biopsia testicular para mejorar los resultados de las TRA.

INDICACIONES

- Pacientes con factores de riesgo de infertilidad masculina modificables cambiando el estilo de vida, como por ejemplo el tabaquismo.
 - En estos pacientes se debe ofrecer ya que los resultados pueden reforzar la importancia del cambio de estilo de vida, predecir la fertilidad y hacer una monitorización de la respuesta a la intervención.

Recomendaciones para el estudio genético e inmunológico en la disfunción reproductiva[☆]

**María Concepción Alonso-Cerezo^{a,b,*}, Mercedes Calero Ruiz^{c,d},
Venancio Chantada-Abal^{f,g}, Luis Alfonso de la Fuente-Hernández^{h,i},
Inmaculada García-Cobaleda^{j,k}, Carlos García-Ochoa^l,
José Miguel García-Sagredo^{m,n}, Rocío Nuñez^ñ, Rafael Oliva^{o,p},
María Orera-Clemente^{q,r}, David Pintado-Vera^{s,t} y Silvia Sánchez-Ramón^{u,v}**

^a Asociación Española de Biopatología Médica-Medicina de Laboratorio, Madrid, España

^b Genética Clínica, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria, Madrid, España

^c Asociación Española del Laboratorio Clínico, Madrid, España

^d UGC Intercentros Laboratorio Clínicos, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, España

^f Asociación Española de Urología, Madrid, España

^g Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, España

^h Sociedad Española de Fertilidad, Madrid, España

ⁱ Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid, España

^j Sociedad Española de Medicina de Laboratorio, Barcelona, España

^k Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, España

^l Centro de Fertilización in Vitro de Asturias, Oviedo, España

^m Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

ⁿ Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, España

^ñ Unidad de Reproducción, Clínica Tambre, Madrid, España

^o Asociación Española de Andrología, Córdoba, España

^p Unidad de Genética, Departamento de Biomedicina, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona, Servicio de Genética y Biología Molecular, Hospital Clínico de Barcelona, Instituto de Investigación Biomédica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

^q Asociación Española de Genética Humana, Madrid, España

^r Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^s Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, Madrid, España

^t Sección de Esterilidad e Infertilidad, Hospital Quirón, Pamplona, España

^u Sociedad Española de Inmunología, Barcelona, España

^v Servicio de Inmunología, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, España

Recibido el 19 de febrero de 2018; aceptado el 21 de febrero de 2018

Recomendaciones para el estudio genético e inmunológico en la disfunción reproductiva[☆]

María Concepción Alonso-Cerezo^{a,b,*}, Mercedes Calero Ruiz^{c,d},
Venancio Chantada-Abal^{f,g}, Luis Alfonso de la Fuente-Hernández^{h,i},
Inmaculada García-Cobaleda^{j,k}, Carlos García-Ochoa^l,
José Miguel García-Sagredo^{m,n}, Rocío Nuñez^ñ, Rafael Oliva^{o,p},
María Orera-Clemente^{q,r}, David Pintado-Vera^{s,t} y Silvia Sánchez-Ramón^{u,v}

^a Asociación Española de Biopatología Médica-Medicina de Laboratorio, Madrid, España

^b Genética Clínica, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria, Madrid, España

^c Asociación Española del Laboratorio Clínico, Madrid, España

Fragmentación del
ADN

Baja

Esterilidad de origen desconocido

Fallos repetidos con las TRA

Calidad embrionaria deficiente

Abortos de repetición

Episodio febril los 3 meses previos a la TRA

Varicocele

Varón por encima de los 50 años

Infecciones de vía seminal

^d Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^e Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, Madrid, España

^f Sección de Esterilidad e Infertilidad, Hospital Quirón, Pamplona, España

^g Sociedad Española de Inmunología, Barcelona, España

^h Servicio de Inmunología, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, España

Recibido el 19 de febrero de 2018; aceptado el 21 de febrero de 2018

CONCLUSIONES

- Fragmentación del ADN espermático se correlaciona con malos resultados en la reproducción.
- No hay un consenso respecto al espécimen, ensayo, punto de corte clínico, tratamientos, etcetera...
 - Nuestra práctica: ↓↓tasa de fragmentación usando muestra de REM.
- Casi todos los organismos todavía no apoyan utilizar la fragmentación del ADN espermático de forma rutinaria en la reproducción asistida.

MALDITO!!!



COOORRE!!!

