

FRAGMENTACIÓ DEL DNA ESPERMÀTIC

MARGA ESBERT,¹ ALBERTO PACHECO,² MIREIA FLORENSA,¹ MARISSA RIQUEROS,¹
MARTA MARTÍN,¹ AGUSTÍN BALLESTEROS¹ I GLORIA CALDERÓN¹

¹ *IVI Barcelona.*

² *IVI Madrid.*

Adreça per a la correspondència: Marga Esbert. IVI Barcelona. General Mitre, 14.
08017 Barcelona. Adreça electrònica: *mesbert@ivi.es*.

RESUM

La fragmentació del DNA és la conseqüència final de l'apoptosi. En el testicle és ben sabut que el camí utilitzat per controlar el nombre adequat de cèl·lules germinals mitjançant cèl·lules de Sertoli depèn de la via Fas. Tot i això, hi ha espermatozoides que han estat assenyalats per prendre la via de l'apoptosi, que s'escapen d'aquest procés. Altres fonts possibles de dany al DNA espermàtic poden ser l'estrès oxidatiu, provocat per radicals lliures d'oxigen (sovint produïts per leucòcits presents en l'ejaculació, però també per part d'altres espermatozoides), i també processos naturals, com ara la recombinació i l'empaquetament de la cromatina, que impliquen la formació de fragments en les cadenes de DNA. La relació entre la fragmentació del DNA espermàtic i l'esterilitat masculina sembla clara, però, en qualsevol cas, encara hi ha controvèrsia sobre l'efecte d'aquesta fragmentació quan se segueixen processos de reproducció assistida, ja que hi ha passos naturals que són esquivats i també hi ha un efecte oocitari molt important.

Paraules clau: espermatozoides, esterilitat, fragmentació del DNA.

SPERM DNA DAMAGE

SUMMARY

DNA fragmentation is the last phenomenon occurred during apoptosis. It is known that Fas-mediated apoptosis is the way used in testes to control the number of germ cells that are excessive with the supportive capacity of the Sertoli cells. Even though, spermatozoa that have been earmarked to undergo apoptosis escape this process. Other potential source of sperm DNA damage is oxidative stress due to reactive oxygen species (produced by leukocytes present in ejaculate, but also by other spermatozoa) and deficiencies in natural processes such as recombination and chromatin packaging that involves the induction

of DNA strand breaks. It seems clear that DNA damage on sperm is related to male fertility but it is still controversial if this DNA fragmentation has an effect when Assisted Reproduction Techniques are performed, due to natural steps are bypassed and there is also an oocyte effect that can not be forgotten.

Key words: DNA fragmentation, infertility, spermatozoa.

INTRODUCCIÓ

L'apoptosi, o mort cel·lular, és un fenomen fisiològic necessari per a un desenvolupament, manteniment de l'estructura tissular i reciclatge cel·lular correctes. Aquest procés està associat a diferents canvis en la cèl·lula, tant bioquímics com físics, que afecten el citoplasma, la membrana plasmàtica i, finalment, el nucli, que es fragmenta mitjançant endonucleases (Lawen, 2003).

La mort cel·lular passa espontàniament en el cicle de l'epiteli seminífer, i aquest procés s'esdevé en estadis específics de l'espermatogènesi per tenir un control sobre la producció d'espermatozoides. S'ha observat que l'apoptosi (determinada com a fragmentació del DNA mitjançant anàlisi ultraestructural) és anormalment freqüent en els espermatozoides ejaculats de pacients estèrils (Irvine *et al.*, 2000).

LA CROMATINA DE L'ESPERMATOZOIDE

Les dues principals diferències entre el nucli de l'espermatozoide i el de qualsevol cèl·lula somàtica són la ploïdia i l'organització.

La meiosi té com a finalitat la reducció de la càrrega genètica a la meitat, de manera que quan es produeixi la fecundació es torni a la dotació diploide dels organismes. El nucli de cada espermatozoide conté només un joc de cromosomes complet, mentre que en el nucli de les cèl·lules somàtiques n'existeixen dues còpies.

El DNA espermàtic s'organitza d'una manera específica, tot mantenint la cromatina compacta i estable. Aquesta organització permet, no tan sols el manteniment de la informació genètica que es transferirà a l'oòcit, sinó també assegurar que el DNA arribi en bon estat físic i químic perquè l'embrió tingui un accés fàcil a la informació genètica.

El major grau de compactació s'aconsegueix amb la unió del DNA a proteïnes de transició en els espermatòcits, que són substituïdes per protamines en les espermàtides.

Els espermatozoides d'homes fèrtils tenen el DNA estable i es pot descondensar fàcilment, en el moment adequat, durant el procés de la fecundació.

FONTS DE FRAGMENTACIÓ DEL DNA ESPERMÀTIC

Empaquetament anormal de la cromatina

L'activitat endonucleasa (per part de la topoisomerasa II) durant el canvi d'histones per protamines és imprescindible. Aquests enzims han de tallar i després unir correctament el DNA, perquè s'alliberi l'estrès de torsió. Si hi ha alguna alteració en el control d'aquest procés, poden existir ruptures de DNA que no siguin reparades (McPherson i Longo, 1992).

Radicals lliures d'oxigen

Fisiològicament, els ROS són necessaris tant per a la hiperactivació espermàtica, que permet a l'espermatozoide moure's pel tracte genital femení i travessar les cèl·lules del cúmul, com per a la peroxidació lipídica, necessària per la fusió amb la zona pel·lúcida.

L'estrès oxidatiu és originat per una excessiva generació de radicals lliures per part dels espermatozoides mateixos o els leucòcits. L'efecte pel que fa a l'esperma és molt gran, a causa de la seva poca capacitat de defensa antioxidant en els espermatozoides (Lamirande i Cagnon, 1995) i també de la gran quantitat d'àcids grassos poliinsaturats de la seva membrana (Alvarez i Storey, 1995).

Els radicals lliures actuen sobre mecanismes que inclouen la peroxidació de la membrana plasmàtica, i pel que fa a la integritat de la cromatina espermàtica, són l'origen de ruptures de cadena simple i doble de DNA i també de modificació i deleció de bases.

Apoptosi abortiva

Durant l'espermatogènesi, tal com ja hem dit, l'apoptosi limita l'excés del nombre d'espermatozoides que poden mantenir les cèl·lules de Sertoli mitjançant la síntesi de FasL. Quan hi ha una falta de sincronització, els espermatozoides acaben l'espermatogènesi, tot i que en realitat haurien d'acabar el procés de mort cel·lular. S'ha observat que en pacients amb paràmetres seminals per sota del que marca la normalitat, hi ha una major presència de fragmentació de DNA en els espermatozoides que arriben a ser ejaculats. Aquest fenomen ha estat explicat per la teoria de l'apoptosi abortiva (Sakkas *et al.*, 1999).

L'apoptosi abortiva tindria com a conse-

qüència el fet de que espermatozoides que han estat marcats per ser eliminats (possiblement per eliminar cèl·lules germinals defectuoses pel que fa al *pool* genètic) apareixerien en la població d'espermatozoides ejaculats.

TÈCNiques PER QUANTIFICAR EL DANY EN EL DNA ESPERMÀTIC

S'han desenvolupat diferents tècniques per a la detecció i quantificació de dany en el DNA, algunes àmpliament utilitzades en l'estudi de cèl·lules somàtiques, i d'altres pensades exclusivament per a cèl·lules espermàtiques. A continuació es descriuen les quatre més utilitzades.

SCSA: *sperm chromatin structure assay* (Evenson *et al.*, 1980)

És una de les tècniques més emprades, tot i tenir com a limitació el fet de mesurar la susceptibilitat del DNA a ser desnaturalitzat *in situ* (després de ser exposat a un pH àcid) i no específicament ruptures en el DNA. Si la cromatina de l'espermatozoide és normal no s'ha de descondensar. Després es tenyeix amb taronja d'acridina, que és un fluorocrom metacromàtic que emet llum verda quan s'intercala en cadenes de DNA dobles (DNA intacte) i en vermell si són cadenes senzilles (DNA fragmentat).

Amb l'ajuda d'un citòmetre de flux equipat amb un làser d'argó, i després de la preparació i tinció, es compten 5.000-10.000 cèl·lules en cinc minuts. Les dades del citòmetre es bolquen en una base de dades, i un programa informàtic determina la proporció d'espermatozoides amb nivells de fluorescència vermella (DNA fragmentat) i fluorescència verda (espermatozoides immadurs). D'aquestes dades es pot obtenir el

DFI (índex de fragmentació del DNA). Tot i que l'SCSA és una mesura indirecta de ruptura de cadena de DNA, hi ha estudis que troben bona correlació entre el DFI i la proporció de cèl·lules positives amb l'assaig del TUNEL i del cometa.

TUNEL: *Tdt-mediated-dUTPnick-end labelling* (Gorczyca *et al.*, 1993)

Quantifica la incorporació de trifosfat de desoxiuridina (dUTP) a ruptures 3'-OH de cadena senzilla o doble en una reacció catalitzada per un enzim transferasa. El senyal augmentarà amb el nombre de fragments, i podrà ser quantificat tant amb citometria de flux com amb microscòpia fluorescent.

Per crear controls negatius, cal que es prepari una solució de reacció sense la terminal transferasa, i per crear controls positius, les mostres es tracten amb DNAasa i durant 30 min i després es marquen amb la fluorescència.

Assaig del cometa (Hughes *et al.*, 1996)

També és conegut com *electroforesi de cèl·lules aïllades*, i és una tècnica àmpliament utilitzada per determinar dany en el DNA de cèl·lules somàtiques. En l'estudi de fragmentació del DNA espermàtic, se submergeixen les cèl·lules en una capa d'agarosa molt fina, es lisen i se sotmeten a electroforesi. Posteriorment es tenyeixen i es marquen amb tinció fluorescent. Els fragments de cadenes de DNA migren cap a l'ànode i tenen l'aparença d'un cometa, i el dany serà quantificat mesurant el material genètic que s'ha desplaçat del nucli a la cua.

La visualització del DNA es realitza utilitzant un microscopi de fluorescència. Les mesures de l'halo es realitzen mitjançant l'anàlisi amb ordinador de la imatge, i es re-

gistra la longitud de la cua, el moment i el percentatge de DNA de la cua amb programes informàtics (vegeu la figura 1).

SDC: *sperm chromatin dispersion test* (Fernández, 2003)

Està basat en la capacitat que té el DNA intacte d'expandir-se sota condicions en què s'eliminen les proteïnes que li donen la seva estructura. Els espermatozoides amb el DNA fragmentat, un cop immersos en una matriu d'agarosa i exposats a solucions de lisi, no poden formar un halo. Un DNA intacte sí que és capaç de formar un halo. Un cop tenyits els nuclis es podran classificar en quatre categories: halo gran, halo mitjà, halo petit, i cèl·lules sense halo.

El principal avantatge d'aquest mètode és el poc cost econòmic i temporal; la subjectivitat a l'hora de classificar la mida de l'halo és un dels seus inconvenients.

RELACIÓ ENTRE LA FRAGMENTACIÓ DEL DNA ESPERMÀTIC I L'ESTERILITAT

Per ara no hi ha consens a l'hora de donar un valor pronòstic al percentatge de fragmentació en el DNA espermàtic sobre les possibilitats d'aconseguir un embaràs. Tot i que sembla que hi ha evidències en la literatura que demostren que el dany influeix en la fertilitat, no està clar en quina mesura. Tampoc no hi ha consens a l'hora de decidir quina tècnica cal utilitzar per determinar el dany genètic dels espermatozoides, ni tampoc hi ha un protocol estàndard que es pugui seguir.

La comunitat científica sembla que té ganes d'integrar el test en la rutina clínica, però els estudis publicats sobre aquest tema

compten amb els problemes de qualsevol nova prova que es vol introduir, com, per exemple, poca població analitzada, diferents dissenys segons els diferents estudis i conclusions que entren en conflicte.

La nostra experiència

A l'IVI Barcelona s'han realitzat tres estudis amb la fragmentació del DNA espermàtic com a motiu principal. Sempre s'analitza el dany utilitzant la tècnica del TUNEL, fent servir el *kit* de Roche In Situ Cell Death Detection Kit, fluoresceïna i, seguidament, citometria de flux per quantificar aquest dany.

En primer lloc vam analitzar l'efecte de la tècnica de capacitació espermàtica (Esbert *et al.*, 2007a), que és imprescindible a l'hora de realitzar un tractament de reproducció assistida, pel que fa al dany que presentaven els espermatozoides en el DNA. Estudiant cent sis mostres seminals abans i després de ser sotmeses a gradients de densitat vam observar una menor taxa de fragmentació després de preparar la mostra (17,58 %, 95 % CI 15,02-20,15 %) respecte de la mostra abans de capacitar (25,31 %, 95 % CI 22,34-28,28 %) ($p < 0,001$).

Es va trobar una correlació directa entre el percentatge de dany després de la capacitació i el total d'espermatozoides mòbils progressius recuperats ($r = -0,32$, $p = 0,001$) i, a més, quan aconseguíem una bo-

na recuperació d'espermatozoides progressius (≥ 75 % AB) la fragmentació era significativament menor (14,84 % 11,82-17,87 %) que quan no havíem recuperat aquest percentatge (24,21 % 95 % CI 20,03-28,38 %) ($p < 0,001$).

També ens va interessar saber l'efecte de l'edat sobre el dany genètic dels espermatozoides (Esbert *et al.*, 2007b). Vam analitzar cent dinou mostres seminals de pacients, i vam observar una clara relació positiva entre l'edat i el dany genètic quan s'analitzaven les mostres ejaculades ($r = 0,21$, $p = 0,023$). Aquesta correlació desapareixia quan les mostres eren capacitades ($r = 0,14$, $p = 0,14$), possiblement per la selecció que és capaç de fer aquesta tècnica sobre els espermatozoides més funcionals.

El darrer estudi (Esbert *et al.*, 2007c) ha estat realitzat per valorar l'efecte de la fragmentació del DNA quant a l'èxit que tindrà un cicle de fecundació *in vitro*. Es van incloure cent setanta-cinc cicles de FIV, en vuitanta-dos s'utilitzaven òvuls propis de la pacient, i en els noranta-tres cicles restants es van utilitzar òvuls de donants sanes. La fragmentació en el DNA espermàtic es mesurava en una alíquota de la mostra seminal utilitzada pel cicle de FIV mateix.

No vam observar correlació entre la fragmentació en el DNA espermàtic i la capacitat dels espermatozoides de fecundar amb FIV convencional ($r = 0,02$, $p = 0,88$) ni microinjecció intracitoplasmàtica ($r = -0,15$, $p = 0,12$). No es van trobar diferències en la

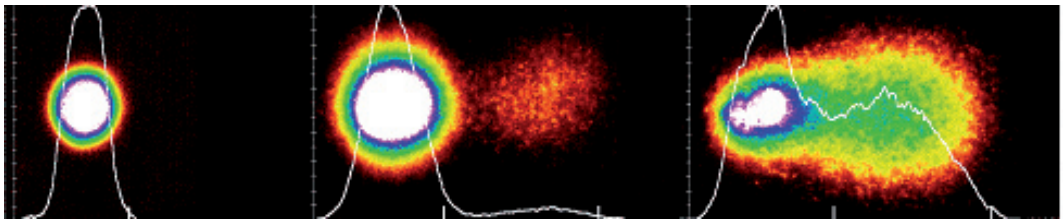


FIGURA 1. Imatges d'espermatozoides després de l'assaig del cometa, amb un 0 %, un 10 % i un 45 % de DNA que ha migrat cap a l'ànode quan han estat sotmesos a electroforesi.

fragmentació present en pacients embarassades respecte de les no embarassades. El percentatge de fragmentació de DNA en parelles que van patir un avortament va ser significativament major (29,71 %, 95 % CI 19,02-40,42 %) que en les parelles que no en van tenir cap (17,82 %, 95 % CI 14,42-21,22 %) ($p = 0,015$); l'edat mitjana de les dones era similar en els dos grups.

Les revisions recents (Zini i Libman, 2006) i els estudis amb gran població estudiada (Lin, 2008) deixen clar que no és possible arribar encara a un consens en les publicacions científiques: mentre alguns autors troben una menor taxa de fecundació, d'embaràs i d'implantació quan hi ha un nivell de fragmentació, d'altres no en troben. Aquests resultats també varien en funció de la prova utilitzada per mesurar el dany.

CONCLUSIONS

Els radicals lliures i de l'apoptosi tenen com a conseqüència la fragmentació del DNA espermàtic. El possible valor pronòstic d'aquest dany genètic no resulta tan satisfactori, probablement perquè les mostres es capaciten abans de ser utilitzades i perquè el paper de l'òvul també és important a l'hora de reparar el dany.

El temps i les publicacions amb una gran població analitzada seran els que donaran el valor real a l'estudi d'aquesta fragmentació en el DNA espermàtic.

BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. (1995). «Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa». *Mol. Reprod. Dev.*, 42: 334-346.

ESBERT, M. A.; SAN CELETINO, M.; VIDAL, F.; BALLESTEROS, A.; CALDERÓN, G. (2007b). «Impact of sperm

DNA fragmentation on embryo quality, pregnancy and miscarriage rate in IVF cycles of patients and oocytes recipients» *Fertil. Steril.*, 88, S31.

ESBERT, M.; PACHECO, A.; FLORENSA, M.; RIQUEROS, M.; SAN CELESTINO, M.; VERNAEVE, V.; VIDAL, F.; BALLESTEROS, A.; CALDERON, G. (2007a). «Relationship between male age and sperm DNA fragmentation». *II Congrés IVI Internacional (Barcelona)*. [Pòster]

ESBERT, M.; PACHECO, A.; FLORENSA, M.; RIQUEROS, M.; SAN CELETINO, M.; VERNAEVE, V.; VIDAL, F.; BALLESTEROS, A.; CALDERÓN, G. (2007c). «Importancia de la técnica de capacitación espermática en la fragmentación del DNA del espermatozoide». *IV Congrés Nacional de l'Associació Espanyola de Biòlegs de la Reproducció (Bilbao)*. [Pòster]

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. (1980). «Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility». *Science*, 210: 1131-1133.

FERNANDEZ, J. L.; MURIEL, L.; RIVERO, M. T.; GOYANES, V.; VAZQUEZ, R.; ALVAREZ, J. G. (2003). «The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation». *J Androl.*, 24: 59-66.

GORZYCA, W.; TRAGANOS, F.; JESIONOWSKA, H.; DARZYNKIEWICZ, Z. (1993). «Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells». *Exp. Cell. Res.*, 207: 202-205.

HUGHES, C.; LEWIS, S.; MCKELVEY-MARTIN, V.; THOMPSON, W. (1996). «A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay». *Mol. Hum. Reprod.*, 2: 613-619.

IRVINE, D. S.; TWIGG, J.; GORDON, E.; FULTON, N.; MILNE, P.; AITKEN, R. J. (2000). «DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality». *Journal of Andrology*, 21: 33-44.

LAMIRANDE, E. DE; CAGNON, C. (1995). «Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects». *Hum. Reprod.*, 10: 15-21.

LAWEN, A. (2003) «Apoptosis: an introduction». *Bio Essays*, 25: 888-896.

LIN, M. H.; KUO-KUANG, L. R.; LI, S. H.; LU, C. H.; SUN, F. J.; HWU, Y. M. (2008). «Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates» *Fertil. Steril.*, 90: 352-359.

MCPHERSON, S. M. G.; LONGO, F. J. (1992). «Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and

- unique sensitivity of elongating spermatids». *Mol. Reprod. Dev.*, 31: 268-279.
- SAKKAS, D.; MARIEHOZ, E.; MANICARDI, G.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P. G.; BIANCHI, U. (1999). «Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa». *Reviews of Reproduction*, 4: 31.
- ZINI, A.; LIBMAN, J. (2006). «Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction». *CMAJ*, 175: 495-500.