

¿ES ÚTIL EL ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO PARA LA INDICACIÓN DE IAC COMO TRA?

IS THE SPERM DNA FRAGMENTATION TEST USEFUL TO THE IUI INDICATION AS ART?

María José Lázaro, Laura Vidal, Concepción Linares, Luz Rodríguez.

Laboratorio de Andrología, Unidad de Reproducción Humana, Servicio de Ginecología y Obstetricia, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

e-mail: lrodriguezr@fjd.es

Fecha recepción: 30 Septiembre 2010 · Fecha aceptación: 31 Octubre 2010

RESUMEN

Objetivo: Valorar la utilidad de realizar el test de fragmentación de ADN espermático para indicar una IAC como técnica recomendada a una pareja infértil en la Unidad de Reproducción de la Fundación Jiménez Díaz.

Ubicación: Laboratorio de Andrología, Unidad de Reproducción, Servicio de Ginecología y Obstetricia, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Material: Kit de fragmentación de ADN espermático Halosperm de Halotech, tinción Diff-Quick, microscopio de campo claro.

Diseño: Durante el periodo comprendido entre abril y junio de 2010, se realizó el test de fragmentación de ADN espermático a las muestras de semen procedentes de aquellos pacientes que cumplían los siguientes criterios de inclusión: REM mayor o igual a 5 millones y edad del varón menor o igual a 45 años.

Conclusión: En este grupo de pacientes el estudio de los niveles de fragmentación de ADN espermático no aporta información adicional al estudio de semen para indicar la TRA que se realiza en nuestra unidad. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):39-41.

Palabras clave: ADN, fragmentación, muestra seminal, IAC

SUMMARY

Aim: To assess the usefulness of sperm DNA fragmentation test to indicate IUI to an infertile couple as recommended technique in the Reproduction Unit of Fundación Jiménez Díaz.

Location: Andrology Laboratory, Reproduction Unit, Gynaecology and Obstetrics, Fundación Jiménez Díaz, Madrid

Material: Kit Halosperm from Halotech for sperm DNA fragmentation, Diff-Quick staining, light microscope.

Design: Between April and June 2010, DNA fragmentation test was done in semen samples from patients who complied with the following inclusion criteria: REM greater or equal to 5 million, male younger or equal to 45 years old.

Conclusion: In this group of patients, the study of the levels of sperm DNA fragmentation does not provide additional information to the study of sperm for ART which is performed in our Unit. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1): 39-41.

Key words: ADN, fragmentation, sperm sample, IUI

INTRODUCCIÓN

La Inseminación Artificial Conyugal (IAC) es la primera opción terapéutica en aquellas parejas infértiles que presentan, al menos, integridad anatómica de las trompas de Falopio, y un número de espermatozoides con movilidad progresiva tras la capacitación (REM) superior a 5×10^6 Millones (WHO, 1999).

Se sabe que la integridad del ADN paterno es necesaria para la consecución de un embarazo a término (Evenson et al., 1999; Larson et al., 2000; Fernández et al.,

2003), y que existe una correlación negativa entre dicha integridad y la fertilidad tanto in vivo como in vitro (Evenson et al., 1999; Saleh et al., 2002). Además, existe cierta controversia en cuanto a si hay alguna relación entre el porcentaje de fragmentación del ADN espermático y los parámetros seminales analizados rutinariamente como concentración y movilidad (Irvine et al., 2000; Cohen-Bacrie et al., 2009). Esta integridad del ADN espermático se puede estimar, entre otras técnicas, mediante el test SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*), que consiste en producir una descondensación diferencial

de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto.

Evenson et al. (2002), mediante la técnica SCSA, consideraron que valores del índice de fragmentación de ADN espermático entre 25-30% corresponden a un bajo potencial para la fecundación, y valores superiores al 30% corresponden a un potencial muy bajo (cercano a cero). Sergerie et al. (2005) propone un valor umbral del 20% con el ensayo TUNEL, y Fernández et al. (2005) de un 27% usando SCD. Bungum et al. (2007), publicó que

las parejas que realizan IAC tienen una mayor tasa de embarazo cuando el porcentaje de fragmentación es inferior del 30% con la técnica SCSA.

El estudio de semen para Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) que se realiza en la Fundación Jiménez Díaz incluye el análisis del volumen, la concentración, la movilidad y el REM. Éste nos permite evaluar si una muestra de semen es adecuada para realizar una IAC. El valor de REM mínimo recomendado por la OMS 1999 para indicar inseminación conyugal es de 5 millones de espermatozoides móviles. Debido a que en nuestro centro no se tiene en cuenta la integridad del ADN espermático para recomendar IAC como TRA, nos proponemos, como objetivo de este trabajo, valorar la utilidad de la inclusión del test de fragmentación de ADN en el estudio inicial del semen

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio, realizado en el laboratorio de Andrología de la Fundación Jiménez Díaz en el periodo comprendido entre abril y junio de 2010, fueron analizadas un total de 50 muestras seminales.

Criterios de inclusión: Varones cuya edad no supere los 45 años, que hayan obtenido la muestra de semen en la Fundación Jiménez Díaz y ésta haya sido completa, con un periodo de abstinencia inferior a 10 días y con un REM mayor de 5 millones. **Muestras de semen y procesado:** Las muestras fueron recogidas en una sala

privada de la Fundación Jiménez Díaz, cercana al laboratorio de andrología, obtenidas por masturbación en frascos de plástico estériles, y procesadas para el estudio de fragmentación en un tiempo no superior a una hora tras la eyaculación.

El análisis inicial de las muestras fue realizado en base a los criterios de la OMS, evaluando volumen, concentración y movilidad de la misma.

La capacitación espermática, necesaria para el cálculo del REM de la muestra, se realizó mediante gradientes de densidad.

La fragmentación del ADN espermático fue estudiada utilizando el Kit Halosperm, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante; los portaobjetos con la muestra fijada fueron teñidos con Diff-Quick.

El conteo de espermatozoides en los portaobjetos teñidos fue realizado siempre por dos observadores, mediante un microscopio de campo claro a 400 aumentos, contando cada uno de ellos un mínimo de 300 espermatozoides, sin existir diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos observadores. Además, antes del comienzo del estudio, se realizaron 10 conteos de prueba, cuyos resultados fueron contrastados con los obtenidos en un laboratorio con más experiencia en esta técnica, sin que tampoco se observaran diferencias. El análisis estadístico se realizó aplicando el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney.

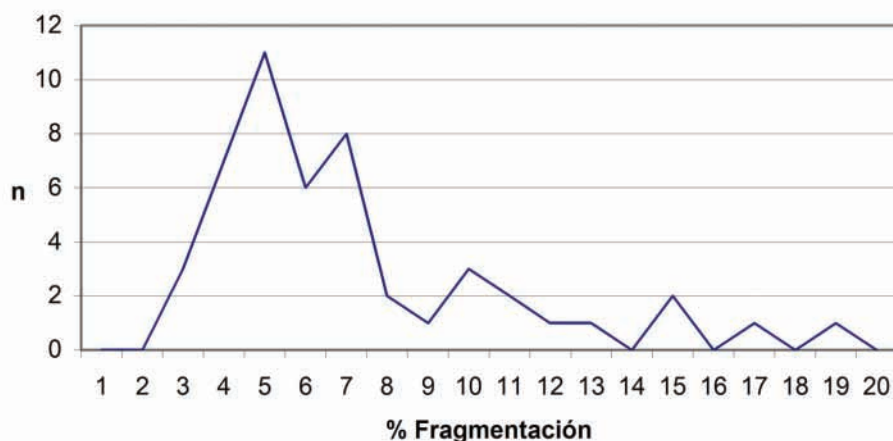


Figura 1. Distribución de las frecuencias de % de fragmentación redondeadas a la unidad

REM (Millones)	N	Media fragmentación (%)
5-10	11	9.50
10-15	13	6.35
15-20	15	7.57
20-25	5	4.56
25-30	4	4.27
>30	2	4.55

Tabla I: Relación entre el REM y el porcentaje de fragmentación

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran los resultados del estudio, donde se observan los porcentajes de fragmentación de las 50 muestras. Se puede observar que todas las muestras presentan una fragmentación inferior al 20% (valor umbral de fragmentación más bajo en la bibliografía consultada), encontrándose 41 de las 50 muestras analizadas por debajo del 10%.

En la tabla I se muestran los resultados de fragmentación obtenidos relacionados con el REM. Parece existir una relación inversa entre la fragmentación del ADN espermático y el REM, pero, puesto que el tamaño muestral de los grupos es pequeño, no podemos aplicar ningún test estadístico.

Al relacionar el periodo de abstinencia y el porcentaje de fragmentación de la muestra seminal, se observa un incremento de la fragmentación del ADN cuando el periodo de abstinencia es superior a 5 días. Esta diferencia resulta estadísticamente significativa al aplicar el test no paramétrico de Mann-Whitney, con una $p = 0,005$ (Tabla II).

periodo de abstinencia (días)	N	Media fragmentación (%)
<5	43	6.16
6-10	7	12.06

Tabla II: Relación entre los días de abstinencia y el porcentaje de fragmentación ($p = 0,005$)

El tiempo medio hasta el inicio del procesamiento de la muestra de semen para el estudio de la fragmentación del ADN fue de 17 minutos, siendo el tiempo de espera más largo de 45 minutos. Se agruparon los resultados estableciendo como punto de corte 15 minutos. En la tabla III se muestra los resultados, observándose que la media de fragmentación es prácticamente igual.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio no se ha encontrado ninguna muestra con un porcentaje de fragmentación por encima de los umbrales de normalidad descritos en la bibliografía consultada (Evenson et al., 2002; Fernández et al., 2005; Sergerie et al., 2005; Bungum et al., 2007). Esto puede ser debido a que todos los eyaculados estudiados tenían un REM superior a 5 millones. Esto implica que, aunque tuvieran algún parámetro seminal alterado, todos tuvieron un recuento total elevado de espermatozoides móviles en el eyaculado. Según Cohen-Bacrie et al. (2009), este tipo de muestras presentan mayoritariamente un grado de fragmentación del 0 al 20%.

En nuestro estudio, al aumentar los días de abstinencia aumenta el porcentaje de fragmentación, lo que concuerda con lo observado por Thomson et al. (2009) y Cohen-Bacrie et al. (2009). El hecho de que el número de pacientes con más de 5 días de abstinencia sea bajo obliga a que esta conclusión sea considerada con reservas, teniendo en cuenta que otros autores como De Jonge et al. (2004) no han observado esta correlación. Según los criterios utilizados en la Fundación Jiménez Díaz, las muestras que constituyen nuestra población de estudio serían aptas para IAC. Al incluir los resultados de fragmentación espermática no se modificaría en ningún caso la indicación de IAC, lo que nos hace pensar que la inclusión sistemática del estudio de fragmentación del ADN espermático en este tipo de pacientes no resultaría útil. Sin embargo, debido a que el número de muestras analizado es bajo, sería conveniente aumentar el tamaño muestral para confirmar el resultado.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestros agradecimientos a URH-García del Real,

TIEMPO HASTA INICIAR LA TÉCNICA (minutos)	N	Media fragmentación (%)
≤ 15	30	7.13
> 15	20	7.90

Tabla III: Relación entre el tiempo hasta inicio de la técnica y el porcentaje de fragmentación. ($p = 0,58$).

por su apoyo a la hora de poner en marcha la técnica de la fragmentación del ADN espermático en nuestro laboratorio y su colaboración en los controles de las pruebas de contaje iniciales.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez J. Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Int J Androl* 2007;5(4):354-363.

Benchaib 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. *Hum Reprod* 2003;18(5):1023-1028.

Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J *et al.* Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22(1):174-179.

Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménéz Y, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 2009;91(5):1801-1805.

De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril* 2004;82(1):57-65.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K *et al.* Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* vol 1999;14(4):1039-1049.

Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm Chromatin Structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23(1):25-43.

Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Álvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24(1):59-66.

Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M *et al.* Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005;84(4):833-842.

Irvine S, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, Aitken J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;21(1):33-44.

Larson KL, De Jonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15(8):1717-1722.

Saleh R, Agarwal A, Nada E, El-Tonsy M, Evenson D, Larson K. Negative effects of sperm nuclear DNA damage on the fertility potential of couples with idiopathic and male-factor infertility. *Fertil Steril* 2002;78(1):S61

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20(12):3446-3451

Thomson LK, Fleming SD, Schulke L, Barone K, Zieschang J-A, Melton Clark A. The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. *Fertil Steril* 2009;92(3):991-1001.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press 1999.

Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26:41-46

Zini A, Sigman M. Are Tests of Sperm DNA Damage Clinically Useful? Pros and Cons. *J Androl* 2009;30(3):219-229.

Rapid-i™ Vitrification System

The world's first integrated closed vitrification system.
Your job just got a lot easier.



The Rapid-i™ Vitrification System was successfully launched at ESHRE 2010, and has since then been introduced all over the world. To learn more please contact your local representative.



www.embiol.com

Vitrolife 
Innovative Cell and Tissue Technology

Oosight. The non-invasive imaging system that reveals critical structures in the oocyte to **enable better grading.**

