



Estudio de la integridad del ADN en la patología espermática. Fragmentación del ADN espermático

 18 min.



Diversos estudios han demostrado que los espermatozoides humanos exhiben una alta tasa de daño en el ADN. En este trabajo la Dra. Pugliese del Laboratorio de Andrología de Manlab nos explica las causas que producen el daño, los métodos bioquímicos para estudiar fragmentación del ADN y las consecuencias del mismo. El índice de fragmentación en espermatozoides es una herramienta ventajosa para conocer la capacidad fecundante del paciente.



Bioq. Mercedes Norma Pugliese

Especialista en Andrología.- Laboratorio de Andrología Manlab



E-mail:
mercedes.pugliese@genesis-manlab.com.ar



Introducción

El laboratorio de Andrología, en actualidad, juega un rol muy relevante, para la evaluación, diagnóstico y terapéutica del factor masculino en el campo de la Reproducción Humana.

Esto se debe principalmente a que, se han producido en los últimos años importantes avances en los estudios del

semen, a través de una mayor standardización de las pruebas que conforman el estudio básico del mismo, la incorporación de pruebas funcionales y moleculares, y a los estudios genéticos relacionados con la integridad el ADN espermático que permiten un diagnóstico más preciso de la patología espermática.

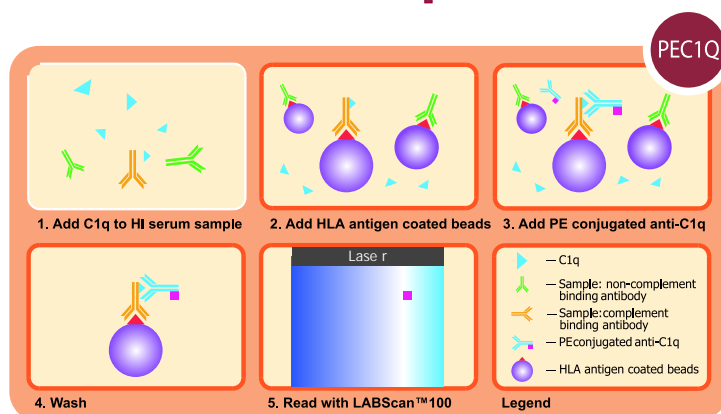
La integridad de la molécula de ADN del espermatozoide es de vital importancia para el inicio y mantenimiento de un embarazo tanto natural, como a través de las Técnicas de Reproducción Asistida.

Los estudios reportados en la literatura científica demuestran, que independientemente de la técnica de reproducción asistida usada un elevado nivel de fragmentación del ADN en espermatozoides puede representar causa



C1qScreen™ Biomarcador

tecnolab
s.a.



- Para la identificación y selección de anticuerpos que unen complemento en suero humano
- Basado en la plataforma Luminex® xMAP®
- Rápido y confiable
- Kits por 25 determinaciones

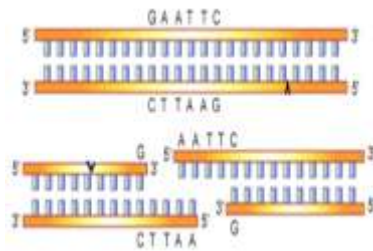
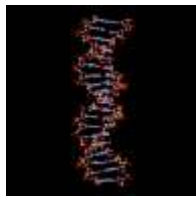
de infertilidad masculina, que los exámenes convencionales del espermograma básico (movilidad, recuento y morfología espermática), no pueden detectar.

La fragmentación del ADN puede producir:

- Fallos repetidos en reproducción asistida
- Mala calidad embrionaria (Efecto paterno tardío)
- Pacientes con aborto a repetición
- Predispone a mutaciones en el desarrollo embrionario con la potencialidad de inducir enfermedades en la descendencia

-¿Qué es la fragmentación del ADN espermático?

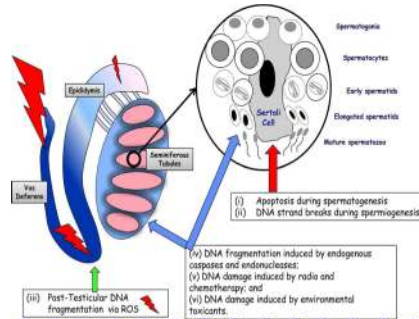
Por diversas causas el ADN empaquetado en la cromatina, puede sufrir fracturas, conocidas como nicks, tanto en la cadena simple como en la doble hélice, fenómeno que recibe el nombre de fragmentación del ADN



¿Por qué puede producirse fragmentación del ADN espermático?

El daño del ADN espermático puede afectar no solo al ADN nuclear sino también el mitocondrial. El daño puede ser inducido por distintos mecanismos: (i) inducción de la apoptosis durante el proceso de espermatogénesis, (ii) roturas durante la remodelación de la cromatina durante la espermiogénesis, (iii) inducido por radicales

libres y caspasas durante su paso a través del epidídimo, (iv) inducido por caspasas y endonucleasas espermáticas, (v) inducido por radio y quimioterapia o (vi) provocado por tóxicos ambientales.



Sakkas, Alvarez, Fertil and Steril 93, 4, March 1, 2010

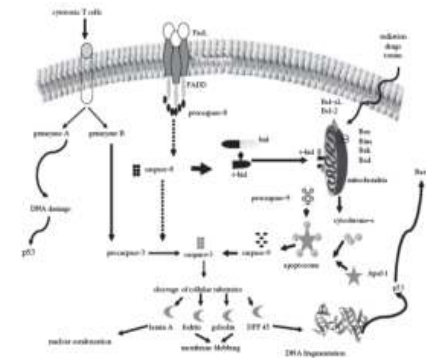
(i) Inducción de la apoptosis durante el proceso de espermatogénesis

La apoptosis juega un rol fisiológico en la producción de las células germinales, regulando la sobreproducción y restringiendo la proliferación anormal durante condiciones inadecuadas para el desarrollo espermático y evitando que se sobrepase la capacidad de soporte que tiene la célula de Sertoli. Durante el proceso de espermatogénesis tiene lugar un screening celular importante regulado por la célula de Sertoli que da lugar a la inducción de apoptosis en un 50- 60% de las células germinales que entran en la meiosis I, por lo se produce entre los eventos celulares la activación de endonucleasas, que generan numerosas rupturas de las cadenas del ADN.

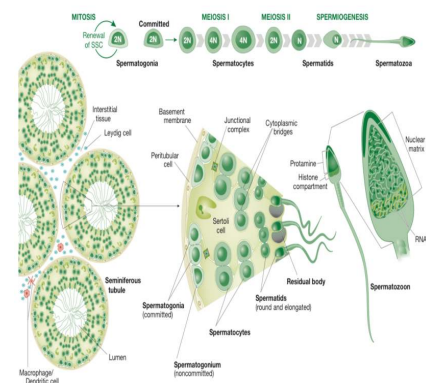
(ii) Deficiencias en el proceso natural de empaquetamiento de la cromatina

Durante la espermiogénesis, en las espermátides, el proceso de reemplazo de las histonas por protaminas, puede producir fragmentación del ADN espermático por torsión debido a que se produce un superenrollamiento del material genético. Este proceso se alivia con la formación de nicks o roturas por acción de las endonucleasas endógenas, que luego son

reparados por acción de la topoisomerasa II previo a la eyaculación. Alteraciones por fallas en la actividad de esta enzima, lleva a que los nicks del ADN permanezcan en los espermatozoides eyaculados, maduros y morfológicamente normales.



Phil. Trans.R.Soc. B (2010)

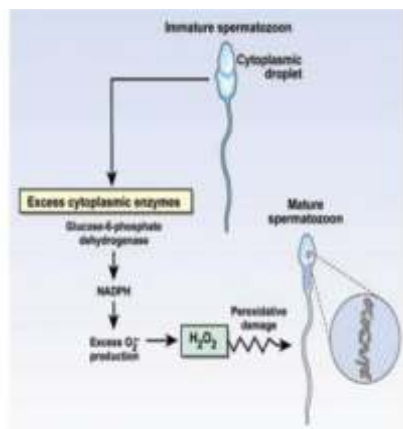


(iii) Inducido por radicales libres y caspasas durante su paso a través del epidídimo
Fragmentación del ADN a nivel posttesticular

Acción directa de los radicales libres

Este daño se produciría después de la espermiación durante la comigración de espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos a la cauda epididimario. Estudios recientes demuestran que espermatozoides inmaduros producen niveles elevados de radicales libres dado que los espermatozoides en el epidídimo se encuentran en íntimo contacto, los radicales libres (anión

superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o el óxido nítrico) producidos por espermatozoides inmaduros o leucocitos, pueden inducir daño del ADN en espermatozoides maduros induciendo oxidación de las bases nitrogenadas del ADN, lo que provoca la formación de bases oxidadas y a posteriori la fragmentación de la doble hélice del ADN espermático.



Acción indirecta de los radicales libres

Los radicales libres actúan también indirectamente a través de la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas que dan como resultado la formación de nicks del ADN.

El daño del ADN que los espermatozoides pueden experimentar en el epididimo tiene una gran importancia clínica, ya que en pacientes con niveles elevados de fragmentación del ADN en semen y fallo repetido de embarazo sin causa aparente, podría recurrirse a la microinyección de espermatozoides testiculares obtenidos mediante la técnica de aspiración (TESA) no extracción quirúrgica de espermatozoides testiculares (TESE).

(iv) Activación de caspasas y endonucleasas espermáticas

La activación de caspasas y endonucleasas espermáticas por factores

fisicoquímicos puede también inducir de fragmentación del ADN espermático. Estas conclusiones están avaladas por numerosos estudios tanto in vitro como in vivo en ratones donde el daño observado, producido en los espermatozoides en su paso por el epididimo podría ser causado por radicales libres o por activación de caspasas y endonucleasas espermáticas.

(v) Fragmentación del ADN inducida por radioy quimioterapia

El uso de agentes quimioterapéuticos y radioterapia puede inducir fragmentación del ADN espermático. La radiación ionizante produce daño celular por fragmentación del ADN de cadena doble y oxidación del ADN por daño en los nucleótidos mediado por el radical hidroxilo.

(vi) Fragmentación del ADN inducida por tóxicos medio ambientales

Estudios realizados por Rubes y col.

Iris[®]
Diagnostics Division

Sistema Automatizado de Urinalysis



BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

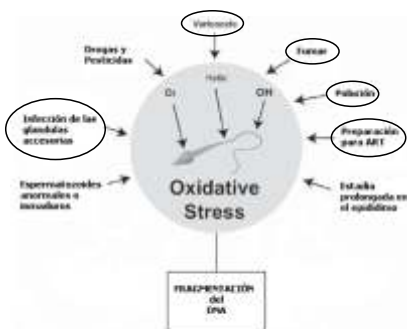
info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

señalan la existencia de una asociación entre la exposición a la contaminación atmosférica y un aumento en los niveles de fragmentación de ADN en espermatozoides humanos.

Se postula que varones homocigotas para la delección del gen de la glutatión-S-transferasa M1 (GSTM1-) tienen una menor capacidad de detoxificar los metabolitos reactivos derivados de hidrocarburos aromáticos policíclicos carcinogénicos (c-PAHs) que se encuentran en la atmósfera. Estos pacientes son más susceptibles a los efectos nocivos de la polución atmosférica sobre integridad de la cromatina espermática.

Los factores externos que influyen en la fragmentación del ADN

El aumento de fragmentación de ADN espermático se asocia con: infección; leucocitospermia, gotas citoplasmáticas de espermatozoides. Fiebre, temperatura testicular elevada, dieta, uso de drogas, tabaquismo, edad avanzada, varicocele, exposición a contaminantes ambientales y ocupacionales.



Marcello Cocuzza, Suresh C. Sikka, Kelly S. Athayde, Ashok Agarwal

Procedimientos bioquímicos para estudiar la Fragmentación del ADN

Se clasifican en dos tipos de acuerdo a si miden:

- Daño real o
- Daño potencial y susceptibilidad a la desnaturalización ácida

Se desarrollaron así dos tipos de estrategias:

I. Aquellas metodologías encaminadas a marcar las roturas, tanto de cadena sencilla como de cadena doble, que se registran de forma natural o fortuita en la molécula de ADN.

Dentro de este grupo, podríamos incluir el uso de procesos enzimáticos para la incorporación in situ de nucleótidos marcados, tales como:

- Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)
- In Situ Nick Translation (ISNT)
- COMETA a pH neutro

Estos ensayos no requieren un paso previo de desnaturalización y miden roturas reales de ADN, tanto de cadena sencilla (ISNT, TUNEL y COMETA) como de cadena doble (TUNEL y COMETA).

II. La segunda estrategia incluye aquellas tecnologías que miden la distinta capacidad de la cromatina y en particular del ADN, para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos, dado que las roturas del ADN incrementan la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización, al iniciarse esta a partir de los extremos de la rotura.

En este grupo se incluyen técnicas tales como

- Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)²¹, el ADN Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH)
- Ensayo Cometa bajo condiciones desnaturalizantes,
- Sperm Chromatin Dispersion (SCD) o Halosperm

Los métodos de mayor aplicación clínica en la actualidad son:

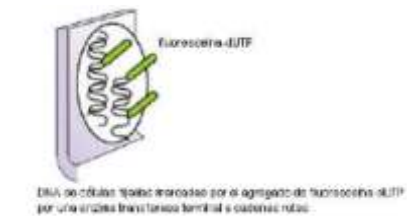
- Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)
- Sperm Chromatin Dispersion (SCD) o Halosperm

1. Daño real

TUNEL (microscopia de fluorescencia)

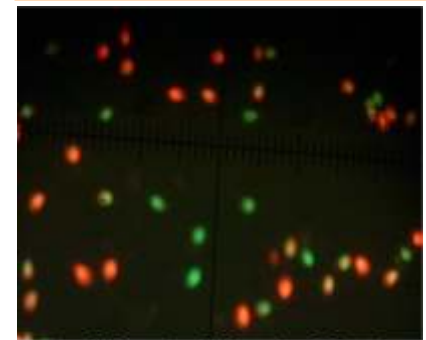
Esta prueba permite visualizar la incorpora-

ción de nucleótidos marcados en los extremos de las roturas existentes en el ADN, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se cataliza, in situ, mediante la acción de una transferasa terminal.



La valoración de la fluorescencia se puede realizar mediante microscopia de fluorescencia ó Citometría de flujo.

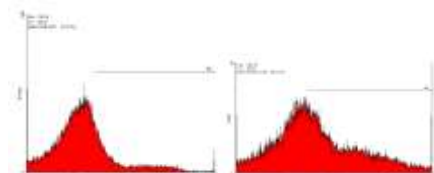
TUNEL Microscopia de fluorescencia



Se incorpora como fluorocromo de contraste Ioduro de propidio
Espermatozoides con ADN fragmentado: Fluorescencia verde
Espermatozoides sin ADN fragmentado: Fluorescencia roja
Valor de corte: Mayor de 20% (prueba positiva)



TUNEL (citometría de flujo) Muestra negativa TUNEL citometría de flujo Muestra positiva



Valor de corte: Mayor de 30% Prueba positiva
Sperm Chromatin Dispersion (SCD) o Halosperm



LABORATORY
INFORMATION
SYSTEM®

www.nextlab.com.ar

Tecnología Integrada

Flexibilidad y poder de parametrización. Software abierto que puede integrarse con instrumentos de cualquier fabricante. Solución ideal para instituciones públicas y privadas al contemplar facturación e integración con sistemas hospitalarios. NextLAB® LIS se presenta en tres versiones: Lite, Professional y Enterprise.

 **NextLAB®**

SOFTWARE INTELIGENTE

LITE

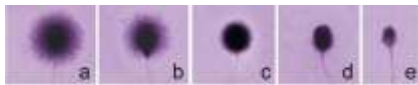
PRO

ENT

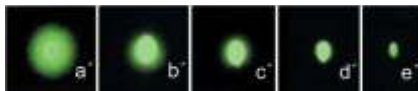
Nicolás de Vedia 1644 1er. Piso "1" C1429EIB
Nuñez, Buenos Aires, Argentina
T. [+5411] 60 91 30 94 Rot
F. [+5411] 60 91 21 00 Ext 3094

Daño potencial y susceptibilidad a la desnaturalización ácida

Los espermatozoides con ADN fragmentado, tras un tratamiento ácido previo, ven impedida en gran medida la liberación de los bucles de ADN, mostrando halos muy reducidos o ausencia de los mismos, al contrario que los espermatozoides sin fragmentación de ADN. Simplemente valorando el tamaño de los halos de dispersión de la cromatina, mediante microscopía tanto de campo claro como de fluorescencia, es posible reconocer presencia de fragmentación de ADN en los espermatozoides humanos.



Microscopía de campo claro
Tinción colorante de Wright



Microscopía de fluorescencia
Tinción SYBR-Green

Los ensayos que miden daño real del ADN de acuerdo a distintos trabajos publicados señalan un mayor valor predictivo en técnicas de reproducción asistida que los ensayos que miden daño potencial del ADN.

Los valores de fragmentación del ADN medidos por TUNEL en los mismos espermatozoides utilizados para tratamientos in vitro se correlacionan de forma significativa con las tasas de embarazo en contraste bajo valor predictivo encontrados con SCSA y SCD.

Si bien el ensayo de TUNEL con frecuencia se utiliza para determinar la apoptosis celular, la positividad de TUNEL no siempre es sinónima de apoptosis, ya que el daño en el ADN inducido por el radical hidroxilo y la radiación ionizante también resulta en fragmentación del ADN de cadena doble que puede ser detectada por TUNEL.

Valor predictivo de los ensayos de fragmentación del ADN

El valor predictivo de un ensayo de fragmentación del ADN depende de varios factores que incluyen las siguientes consideraciones:

- Más del 90% del ADN está compuesto de regiones que no codifican para proteínas (intrones). La probabilidad que el daño al ADN afecte las regiones que sí codifican para proteínas (exones) es muy baja, estas son las que estarán involucradas en el proceso de fertilización.
- El daño puede ser de simple o doble cadena, el primero tendría más posibilidad de ser reparado por el ovocito.
- El daño postesticular inducido por estrés puede dar una combinación de nucleótidos oxidados (8-OH-guanosina) y fragmentación el primero puede ser reparado por el ovocito (efecto iceberg)
- Tipo de ensayo de fragmentación del ADN utilizado
- Preparación del semen para técnicas de reproducción asistida.

La probabilidad que se produzca un embarazo viable en relación a la fragmentación del ADN espermático dependerá de:

- La proporción de espermatozoides con daño en el ADN,
- La dimensión de ADN fragmentado por célula
- El nivel de bases oxidadas en el espermatozoide.
- Las regiones de ADN que estén dañadas (intrones o exones)
- La habilidad del ovocito fertilizado para reparar el daño que no puede ser medido.

Esto puede explicar en parte, porque relativamente altos niveles de ADN fragmentado puede dar como resultado embarazos viables.

- Preparación del semen para técnicas de reproducción asistida.

Las indicaciones clínicas para evaluar fragmentación del ADN espermático en muestras de semen entero y pos selección espermática

- Infertilidad idiopática
- Desarrollo detenido del embrión
- Mal desarrollo del blastocisto
- Fallo repetido de embarazos en ART (FIV/ICSI)
- Abortos recurrentes
- Alteraciones severas en los parámetros seminales
- Varicocele grados II y III
- Edad varón > 40 años
- Congelación de semen: quimio/radioterapia,
- Episodio febril en los últimos 3 meses

Ventajas de las pruebas de fragmentación del ADN espermático

La valoración de fragmentación del ADN proporciona un análisis fiable de la integridad del ADN espermático que puede ayudar a identificar pacientes que están en riesgo de no iniciar un embarazo exitoso. Información sobre la integridad del ADN de espermatozoides puede ayudar al diagnóstico clínico, manejo y tratamiento de la infertilidad masculina y puede ser de valor pronóstico en la evaluación de los resultados de tratamiento con las técnicas de reproducción asistida.

Bibliografía

- Agarwal Ashok, Athayde S.
- Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin
- Damage in Male Infertility: An Evidence Based Analysis
- International Braz J Urol Vol. 33 (5): 603-621
- Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of ADN damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007a; 14: 727-733.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. Value of ADN integrity assays for fertility evaluation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007b; 65: 81-92.
- On the possible origins of ADN damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, Vol.16, No.1 pp. 3-13, 2010.
- Aitken RJ, de Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. *Hum Reprod*: August 2010.
- Aitken R.J Apoptosis and ADN damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology* (2011) 13, 36-42.
- Alvarez J. G. Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Revista Internacional de Andrología*, 5: 354-363, 2007.
- Bennetts LE, Aitken RJ. A comparative study of oxidative ADN damage in mammalian spermatozoa. *Molec Reprod Dev* 2005; 71: 77-87.
- Carrell D. T., Liu L., Peterson C. M. y col. Sperm ADN

fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. Arch Androl, 49: 49-55, 2003.

- Collins J. A., Barnhart K. T., Schlegel P. N. Do sperm ADN integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?. Fertil Steril, 89:823-831, 2007.

- Fernandez J. L., Muriel L., Rivero M. T. y col. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm ADN fragmentation. J Androl, 59-66, 2003.

- Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, Baldi E. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different ADN fragmentation extent and relationship with semen parameters. Hum Reprod 2008; 23: 1035-1043.

- Perez-Crespo M, Moreira P, Pintado B, Gutierrez-Adan A. Factors from damaged sperm affect its ADN integrity and its ability to promote embryo implantation in mice. J Androl 2008; 29: 47-54.

- Sakkas D., Moffatt O., Manicardi G. C y col. Nature of ADN damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. Biol Reprod. 66: 1061-7, 2002.

- Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek AJ. The effects of male age on sperm ADN damage in healthy non-smokers. Hum Reprod 2007; 22: 180-187.

- Schulte Ryan T., Smith Gary D. Sperm ADN damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. J Assist Reprod Genet (2010) 27: 3-12.

- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt

O, Sakkas D. Extent of nuclear ADN damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. Fertil Steril 2004; 82: 378-83.

- Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm ADN fragmentation. Hum Reprod 2004; 19: 611-5.

- Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on ADN damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. PNAS 2006; 103: 9601-6.

- Zini A, Sigman M. Are tests of sperm ADN damage clinically useful?. Pros and cons. J Androl 2009; 30: 219-229.

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

El laboratorio de Andrología de ManLab a cargo de la Dra Mercedes Norma Pugliese ha incorporado:

Estudios del Núcleo espermático

Estudios para evaluar funcionalidad de la cromatina espermática

- Condensación de la cromatina

- Test de Azul de Anilina o Test de Dadoune
- Test de Cromomicina A3 (CMA3)

- Estabilidad de la cromatina

- Estudio de la Estabilidad de la cromatina espermática por detergentes aniónicos

- Heterogeneidad de la Cromatina

- Test de Naranja de acridina

Estudios de la integridad del ADN de la cromatina:

- Fragmentación del ADN (Test de TUNEL)

GEMATEC

equipamiento para medicina

Radiometer Analizador de Inmunoensayo AQT90 FLEX

- Equipo Point of Care con calidad de resultados de laboratorio.
- Parámetros medidos: Troponina T, Troponina I, CKMB (masa), Mioglobina, NT-proBNP, PCR, βhCG y Dimer-D.
- Fácil manejo, software intuitivo, pantalla touch screen.
- Carga continua de muestras, tiempo promedio de resultado 10 minutos.
- Aspiración de muestra a partir de tubo cerrado (sange entera, plasma o suero)
- Completa Bioseguridad para el operador.



QUÍMICA CLÍNICA



Representante en Argentina

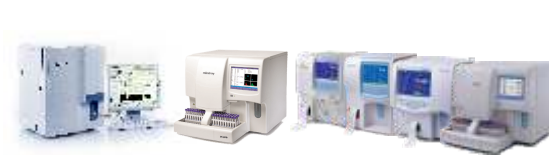
INMUNOLOGÍA



MEDIO INTERNO



HEMATOLOGÍA



Representante en Argentina

RADIOMETER®

mindray

Int. Avalos 3651 - (1605), Munro - Buenos Aires - Argentina

Tel/Fax: (54 11) 4794-7575 / 7676 / 3184 - e-mail: info@gematec.com.ar - Web: www.gematec.com.ar