

TRABAJO FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida

**Fragmentación de ADN espermático:
significación clínica y alternativas
terapéuticas.**

Autor: Sergio García Aragón.

Tutor: Juan Carlos Martínez Soto.

Villaviciosa de Odón, Octubre 2021

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
2	ABSTRACT	2
3	INTRODUCCIÓN.....	3
4	OBJETIVOS	7
5	MÉTODOS	8
6	CUERPO DE LA REVISIÓN	8
6.1	TÉCNICAS DIAGNÓSTICO.....	16
6.2	MEDIDAS TERAPÉUTICAS.....	19
7	DISCUSIÓN	26
8	CONCLUSIONES.....	27
9	BIBLIOGRAFÍA	28

1 RESUMEN

La infertilidad es la incapacidad de lograr gestaciones capaces de evolucionar hasta la viabilidad. Según la Organización Mundial de la Salud, la infertilidad se define como el fracaso para lograr gestación clínica después de 12 meses de relaciones sexuales sin protección. La aportación del factor masculino a la infertilidad de la pareja se encuentra en torno a un 30-50 % de los casos. Los niveles de fragmentación de ADN espermático (SDF) son mayores en parejas infértiles y si el grado de fragmentación es muy elevado el embrión tendrá dificultades para desarrollarse, pero si es leve podría dar lugar a un recién nacido vivo (RNV).

Los principales mecanismos de inducción de daño al ADN y que como consecuencia producen SDF son: mecanismos testiculares como la apoptosis abortiva y maduración defectuosa; fragmentación del ADN post- testicular; factores clínicos como edad, infección, cáncer, ...; factores ambientales.

Existen diversos test o técnicas para evaluar la integridad de la cromatina espermática en los pacientes con infertilidad: Ensayo TUNEL, Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD), Ensayo Comet, Medición de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), Ensayo de la Estructura de la Cromatina Espermática (SCSA), Medición naranja de Acridina (Acridine Orange, AO), Ensayo de Cromomicina A3 (CMA3), Tinción azul de Toluidina (TB), Tinción azul de Anilina (AB).

Esta enfermedad ha sido muy estudiada y presenta varias medidas terapéuticas utilizadas hoy en día: aislamiento selectivo de espermatozoides, criopreservación espermática, prescripción de terapia antioxidante, administración de antibióticos, varicocelectomía, modificaciones del estilo de vida, abstinencia reducida, MACS, PICSI, IMSI, microscopía con luz polarizada, obtención de espermatozoides a través de biopsia testicular.

2 ABSTRACT

Infertility is the inability to achieve pregnancies capable of progressing to viability. According to the World Health Organization, infertility if you define it as the failure to achieve clinical pregnancy after 12 months of unprotected sex. The contribution of the male factor to the infertility of the couple is found in return to 30-50% of the cases. The levels of sperm DNA fragmentation (SDF) are higher in infertile couples and if the degree of fragmentation is very high the embryo will have difficulties to develop but if this level could give rise to a live newborn.

The main mechanisms of DNA damage induction that as a consequence produce SDF are: testicular mechanisms such as abortive apoptosis and defective maturation; post-testicular DNA fragmentation; clinical factors such as age, infection, cancer, ...; environmental factors.

There are various tests or techniques to evaluate the integrity of sperm chromatin in patients with infertility: TUNEL Assay, Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD), Comet Assay, Measurement of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), Acridine Orange Measurement (AO), Chromomycin A3 Assay (CMA3), Toluidine Blue Stain (TB), Aniline Blue Stain (AB).

This disease has been extensively studied and presents several therapeutic measures used today: selective sperm isolation, sperm cryopreservation, prescription of antioxidant therapy, administration of antibiotics, varicocelelectomy, lifestyle modifications, polarized light microscopy, obtaining sperm through of testicular biopsy.

3 INTRODUCCIÓN

La infertilidad es una enfermedad en la que la pareja no es capaz de tener un recién nacido vivo de forma espontánea pese a haber mantenido relaciones sexuales sin protección, de forma regular durante al menos 1 año y afecta a una de cada siete parejas que intentan concebir.

La función esencial de un espermatozoide humano es aportar el genoma paterno a los ovocitos, un requisito esencial para asegurar la fecundación y lógicamente también se le atribuye un papel importante en el desarrollo embrionario. Además, la integridad del ADN del espermatozoide es indispensable en el éxito de la reproducción humana.

La disminución de la calidad del semen es una causa principal de infertilidad masculina. Por lo general, esta mala calidad se caracteriza por una baja concentración, movilidad y/o viabilidad de los espermatozoides. Las técnicas de reproducción asistida (TRA) como la inseminación artificial (IA) y la fecundación “in vitro” (FIV) son medios terapéuticos para el tratamiento de la infertilidad debida al factor masculino [1] cuando la calidad seminal presenta una disminución moderada o leve, pero cuando esa disminución es severa, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es la técnica de elección.

La aportación del factor masculino a la infertilidad de la pareja se encuentra en torno a un 30-50 % de los casos. La infertilidad masculina es una enfermedad con una prevalencia aún mayor que otras enfermedades comunes y se prevé que en 2030 aproximadamente el 4 % de los hombres presentarán esta condición [2].

Hoy en día en todas las clínicas de fertilidad se tratan con asiduidad problemas de infertilidad debido al factor masculino. Por lo general, como mínimo, se realizan seminogramas y recuento de espermatozoides móviles (REM) y en muchos casos (aprox. 20 %) no se encuentran anormalidades en el semen, pero aun así la pareja no es capaz de quedarse embarazada o tener un recién nacido vivo (RNV). Esto se denomina infertilidad de origen desconocido (idiopática).

La evaluación de la concentración, la motilidad y la morfología de los espermatozoides no reflejan la integridad del ADN espermático por lo que sólo el análisis estándar de la muestra seminal no es suficiente para concluir si un hombre es fértil o infértil. Estos parámetros rutinarios del semen no revelan los mecanismos celulares o moleculares de los fallos o disfunciones espermáticas que conducen a la infertilidad, por ello, muchos laboratorios incorporaron técnicas avanzadas de análisis seminal para comprobar la funcionalidad del

acrosoma, condensación de la cromatina o la fragmentación del ADN (SDF) siendo este último parámetro de vital importancia [3].

Estudios revelan que los niveles de fragmentación del ADN del espermatozoide son significativamente más altos en las parejas infértiles, incluso en aquellas que no presentan factor masculino [4]. Si el grado de fragmentación de ADN es elevado el embrión tendrá dificultades para desarrollarse y como consecuencia degenerará, pero si el grado de fragmentación es leve podría dar lugar a un recién nacido vivo. A pesar de que cabe la posibilidad de que el embrión se desarrolle adecuadamente, debido a esa fragmentación, se han reportado casos de recién nacidos vivos con anomalías cromosómicas y otras enfermedades como cáncer relacionadas con elevados niveles de fragmentación en el ADN espermático [2].

Como bien sabemos, la técnica de fecundación “in vitro”, microinyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) es la más utilizada hoy en día en los tratamientos de reproducción asistida (TRA). Según estudios la técnica ICSI incrementa el riesgo de morbilidad en bebés nacidos mediante este procedimiento debido a que, en relación con el tema que abordamos, cabe la posibilidad de que se introduzca un espermatozoide morfológicamente normal pero que presente un severo grado de fragmentación de ADN por lo que el genoma del embrión estaría dañado [2]. Además, destacar que la capacidad del ovocito para iniciar la reparación depende en su mayor parte de la calidad citoplásmica y genómica del ovocito, que a su vez se ven afectados dramáticamente por el aumento de la edad [5].

Como hemos comentado anteriormente, hay parámetros funcionales de los espermatozoides, entre ellos la integridad de la cromatina, que se evalúan para proporcionar información sobre alteraciones de los espermatozoides que no se identifican de forma rutinaria. La condensación incompleta o defectuosa de la cromatina espermática aumenta la susceptibilidad del ADN al daño lo que conlleva al SDF y que puede ser causada por factores extrínsecos y también por factores intrínsecos, aunque la evidencia científica atribuye a las especies reactivas de oxígeno (ROS) como principal factor en el daño al ADN [3]. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son vitales para procesos fisiológicos como apoptosis y capacitación, pero una sobreproducción conduce a varias consecuencias deletéreas, incluido el aumento en los niveles de SDF [6].

A continuación, se muestran los principales mecanismos de inducción de daño al ADN y que como consecuencia producen SDF en los espermatozoides durante la producción o el transporte de los mismos, los cuales se explicarán en profundidad en el apartado de “Resultados”:

- ❖ Mecanismos testiculares como la apoptosis abortiva y maduración defectuosa que dan lugar a roturas en las cadenas del ADN. Roturas de cadena simple (SSB) o de doble cadena (DSB).
- ❖ Fragmentación del ADN post- testicular inducida, principalmente por especies reactivas de oxígeno (ROS) provocando estrés oxidativo (OS). Este daño oxidativo puede provocar apoptosis abortiva por inducción de la activación de caspasas, puede afectar a espermatozoides inmaduros o anormales o puede afectar a aquellos espermatozoides que escaparon de la apoptosis (abortiva) que son susceptibles a ROS.
- ❖ Factores clínicos como edad, infección, cáncer, desequilibrios hormonales, obesidad, diabetes, ...
- ❖ Factores ambientales como calor, toxinas ambientales, radiación, tabaquismo, abuso de drogas, dieta, agentes químicos, estilo de vida, ...

Todos estos mecanismos tanto de manera directa como indirecta pueden provocar la fragmentación de ADN espermático (SDF).

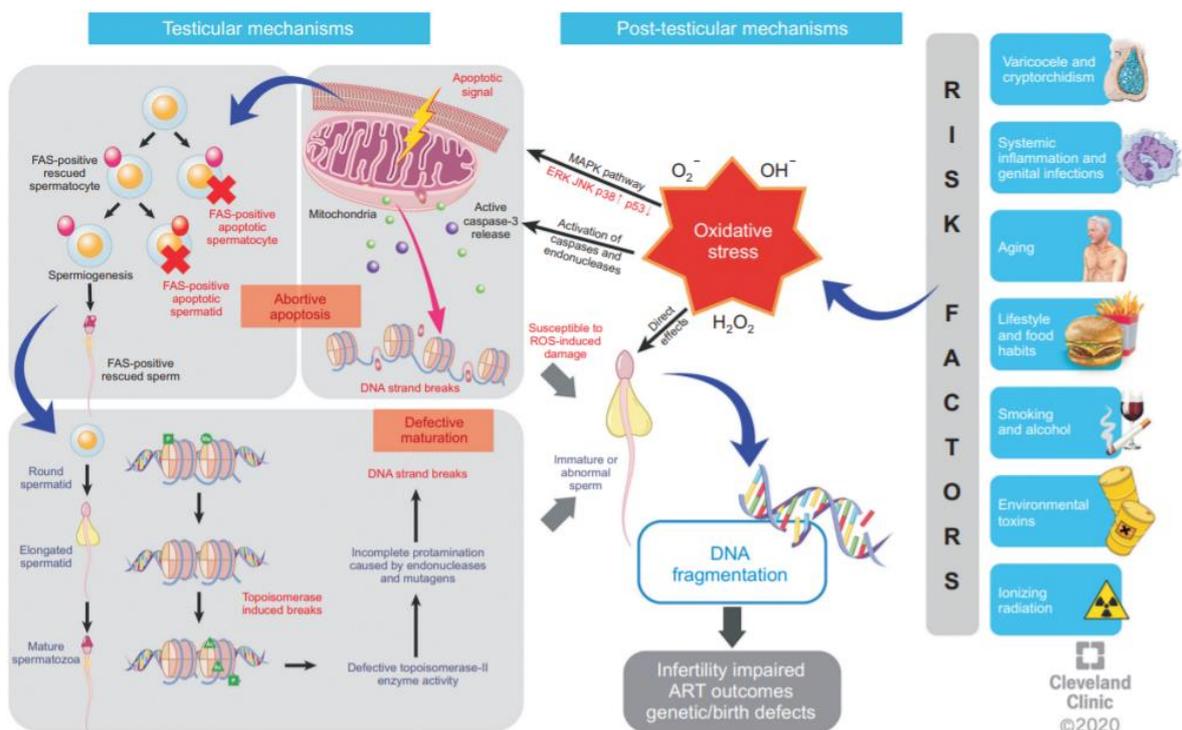


Figura 1. Se muestran los factores intrínsecos implicados en el SDF que son los mecanismos testiculares y los post- testiculares y los factores extrínsecos son la edad, exposición al calor, inflamación/infección, estilo de vida (tabaco, comida basura, ...), toxinas ambientales, radiación, ...

[6].

Tipos de daño al ADN: desajuste de bases, pérdida de base, modificaciones de bases, aductos de ADN, dímeros de pirimidina, roturas monocatenarias (SSB) y roturas bicatenarias (DSB). Cualquiera de estas alteraciones puede inducir SDF y comprometer la concepción natural o los resultados del TRA [6].

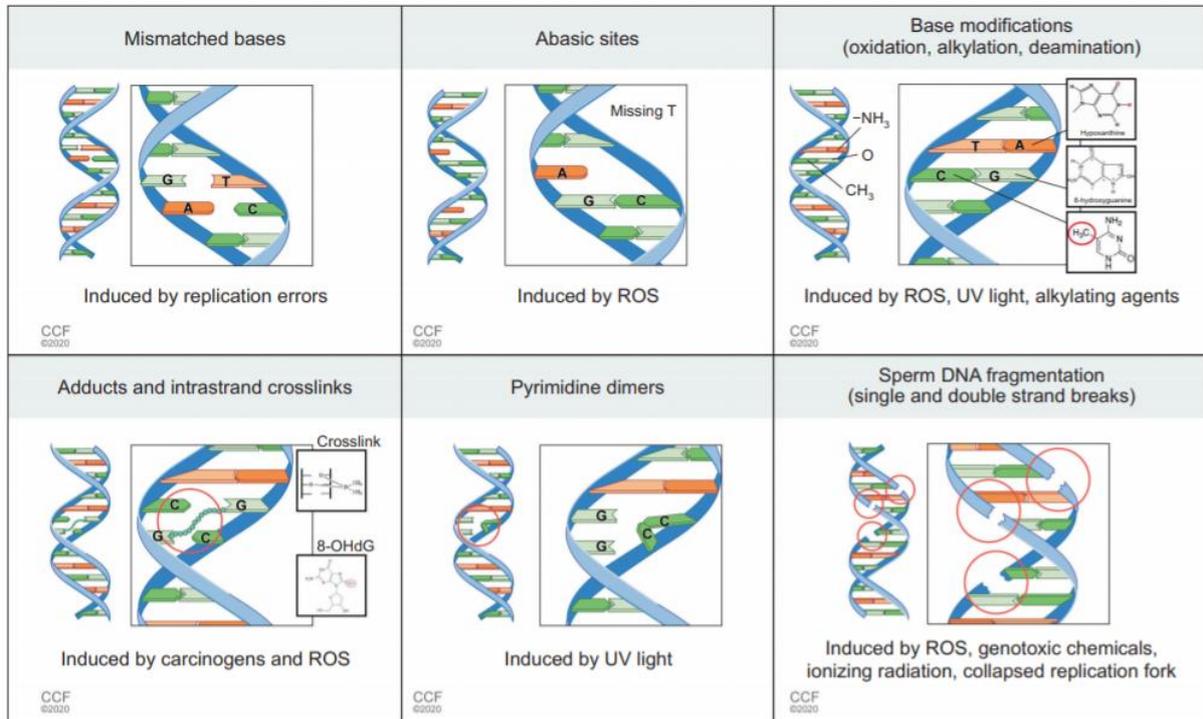


Figura 2. Tipos de daño al ADN [6].

Pese a las consecuencias que los altos niveles de fragmentación de ADN pueden ocasionar en la reproducción humana, no es una determinación que se aconseje realizar de rutina. Las indicaciones para realizar pruebas para determinar SDF son las siguientes: infertilidad inexplicable, abortos recurrentes, varicocele, estilo de vida desaconsejable y tóxicos ambientales [7].

En la actualidad, la mayoría de laboratorios o clínicas de fertilidad disponen de diversos tests o técnicas para evaluar la integridad de la cromatina espermática en los pacientes con infertilidad. Estos procedimientos se explicarán con más detalle más adelante, aunque es necesario destacar los siguientes:

- ❖ Ensayo TUNEL.
- ❖ Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD).
- ❖ Ensayo Comet.
- ❖ Medición de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG).

- ❖ Ensayo de la Estructura de la Cromatina Espermática (SCSA).
- ❖ Medición naranja de Acridina (Acridine Orange, AO).
- ❖ Ensayo de Cromomicina A3 (CMA3).
- ❖ Tinción azul de Toluidina (TB).
- ❖ Tinción azul de Anilina (AB).

Destacar que los más utilizados hoy en día son el SCD, SCSA y ensayo TUNEL.

En esta revisión también se va a realizar una búsqueda exhaustiva de las medidas terapéuticas indicadas para pacientes con distinto porcentaje de fragmentación de ADN espermático, así como alternativas más novedosas y que se están investigando para poder utilizarlas en el futuro.

Algunas de ellas son:

- ❖ Aislamiento selectivo de espermatozoides mediante gradientes de densidad, columnas de lana de vidrio, swim-up, separación electroforética, sistemas de microfluidos.
- ❖ Criopreservación espermática.
- ❖ Prescripción de terapia antioxidante.
- ❖ Administración de antibióticos.
- ❖ Varicocelectomía. Varicocele podría aumentar los niveles de OS.
- ❖ Modificaciones del estilo de vida.
- ❖ Abstinencia reducida.
- ❖ MACS.
- ❖ PICSI.
- ❖ IMSI.
- ❖ Microscopía con luz polarizada.
- ❖ Obtención de espermatozoides a través de biopsia testicular.

4 OBJETIVOS

El trabajo realizado es una revisión bibliográfica en la que se ha realizado una búsqueda profunda de artículos y trabajos realizados en la comunidad científica acerca de la fragmentación de ADN espermático, una de las causas de la infertilidad masculina. Se ha tratado de realizar una recopilación de información acerca de la etiología, desarrollo, prevalencia, métodos de diagnóstico, impacto sobre la salud reproductiva de la pareja y medidas terapéuticas de la enfermedad.

Los puntos a desarrollar son los siguientes:

- Etiología y desarrollo del SDF
- Estudio de la prevalencia de la enfermedad.
- Métodos y técnicas utilizadas para su diagnóstico.
- Análisis del impacto en la salud reproductiva del varón y de la pareja.
- Estudio de las medidas o soluciones terapéuticas actuales e innovadoras.

5 MÉTODOS

En este trabajo es una revisión bibliográfica de diferentes artículos y fuentes relacionados con la enfermedad, con los cuáles se analizarán y desarrollarán los diferentes aspectos de la fragmentación de ADN espermático.

Al tratarse de una enfermedad reconocida y estudiada en la actualidad se llevará a cabo una recopilación de información e introducción de aspectos más actuales o novedosos, así como un análisis crítico de la misma.

Para la búsqueda, primeramente, se introdujeron términos como “sperm dna fragmentation”, “oxidative stress”, “male infertility” en la base de datos PubMed y a través de los artículos encontrados se revisaron otras referencias que resultaron de interés.

6 CUERPO DE LA REVISIÓN

En este apartado se van a desarrollar los objetivos planteados para la revisión bibliográfica.

La población de espermatozoides en el eyaculado puede ser muy heterogénea. Esto parece ser aún más evidente en pacientes cuyos parámetros del semen caen por debajo de los valores normales. La relación entre los parámetros deficientes de los espermatozoides y el daño del ADN en espermatozoides apunta a problemas inherentes en la espermatogénesis en pacientes específicos [8].

SDF es inducida principalmente por mecanismos testiculares como la maduración defectuosa y la apoptosis abortiva que ocurre dentro del testículo, o por mecanismos post- testiculares como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en todo el tracto reproductivo masculino [6]. Sin embargo, también hay factores de riesgo clínicos y ambientales que se verán más adelante.

Se va a describir cómo se produce la apoptosis abortiva pero previamente es necesario explicar brevemente el proceso de espermatogénesis.

La espermatogénesis es un proceso complejo para generar espermatozoides que poseen la mitad de la información genómica paterna. Después de la meiosis en la que un espermatocito diploide derivado de espermatogonias se divide en cuatro espermátidas haploides, éstas se someten a la espermiogénesis para convertirse en espermatozoides, acompañada de eliminación de citosol, condensación nuclear, formación del acrosoma, alargamiento de la cola. La cromatina compactada del espermatozoide, empaquetada por protaminas, permite la protección del genoma de daños en el ADN y la transmisión eficiente del genoma paterno a la descendencia.

La espermatogénesis se puede dividir en dos fases. La primera tiene lugar entre el nacimiento y los 6 meses de edad. Esta fase se caracteriza por la diferenciación de los gonocitos en espermatogonias y es acompañado por una ola masiva de células germinales que experimentan una eliminación apoptótica en los testículos. Este proceso está controlado por las células de Sertoli y se considera un paso importante para la progresión normal de la espermatogénesis en el adulto. En la segunda fase de la espermatogénesis, que comienza con el inicio de la pubertad, se debe asegurar una relación estable entre las células de Sertoli y las células germinales pre y post- meióticas, así como la renovación de las células germinales con el necesario control de calidad de la espermatogénesis, lo que requiere un buen mecanismo regulador y equilibrado para eliminar estas células, la apoptosis.

Después de esta breve introducción, procedemos a explicar el mecanismo por el cual se produce la apoptosis abortiva, que como hemos comentado anteriormente es una de las causas principales de un número elevado de espermatozoides con fragmentación en el ADN en el eyaculado.

Las células germinales que van a ser eliminadas expresan el receptor Fas que es un marcador de apoptosis temprana. A su vez, las células de Sertoli expresan el ligando para ese marcador (FasL) que, si se une a su receptor, induce la apoptosis y seguidamente las células germinales apoptóticas son fagocitadas por las células de Sertoli [8]. Sin embargo, hay espermatozoides que escapan de este proceso apoptótico y como consecuencia aparecen en el eyaculado. Se planteó una hipótesis en un estudio [2] en el que se llevaron a cabo dos posibles causas de por qué aparecen espermatozoides apoptóticos en el eyaculado. La primera es que expresan un receptor Fas disfuncional, y la segunda es que hay muchos espermatozoides que expresan Fas y las células de Sertoli no son capaces de fagocitar a todos. Esta hipótesis se denominó

“Apoptosis abortiva”. Además, estudios han demostrado que el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) también pueden activar rutas apoptóticas y así aumentar el número de espermatozoides que escapan del proceso apoptótico en el eyaculado.

Otra de las causas más influyentes en el aumento de SDF es una maduración defectuosa de los espermatozoides. En la espermiogénesis, específicamente en la etapa donde se produce la elongación de las espermatidas no solo se produce un cambio morfológico y estructural del núcleo sino también la compactación de la cromatina mediante del intercambio de histonas con proteínas de transición y protaminas. Esto es facilitado por una endonucleasa llamada topoisomerasa II, que crea roturas en el ADN para reducir la tensión de torsión y facilitar el desacople de las histonas y la compactación de la cromatina mediante protaminas. Si estas roturas no son reparadas, la incapacidad de compactación de la cromatina puede dar lugar a una maduración defectuosa y la aparición de un elevado porcentaje SDF en el eyaculado. Espermatozoides con defectos en el intercambio de histonas por protaminas presentan morfología anormal y motilidad reducida debido a un fallo en la condensación nuclear, lo que conlleva dificultades en la fertilización. Este fallo en la espermiogénesis también está relacionado con una disminución de la fecundación tras técnicas de FIV e ICSI [6].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son agentes oxidantes, entre los que se incluyen el peróxido de hidrógeno, superóxido y radicales libres. Se ha informado la presencia de niveles elevados de ROS en el semen de entre el 25 y el 40% de los hombres infértiles [8].

El estrés oxidativo seminal no solo altera varias funciones de los espermatozoides, como la motilidad o la reacción acrosómica, sino que también se ha reconocido como la principal causa de daño al ADN de los espermatozoides [2]. Esta condición puede desarrollarse como resultado de un desequilibrio entre la generación de ROS y la actividad de antioxidantes. En general, las bases de ADN y los enlaces fosfodiéster son muy susceptibles a la peroxidación. Además, los espermatozoides son particularmente susceptibles al daño inducido por OS porque sus membranas plasmáticas contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados y el citoplasma contiene bajas concentraciones de enzimas antioxidantes [8].

Una fuerte evidencia sugiere que los altos niveles de ROS median la aparición de roturas de ADN comúnmente observadas en los espermatozoides de hombres infértiles, que al no ser reparadas es cuando se produce el daño al ADN y su fragmentación. Además, estudios en los que el esperma estuvo expuesto a ROS producidos artificialmente resultó en un aumento significativo en el daño del ADN en diversas formas y modificaciones como comentamos en la

introducción: modificación de todas las bases, producción de sitios libres de bases, eliminaciones, cambios en el marco de lectura del ADN, enlaces cruzados de ADN y reordenamientos cromosómicos.

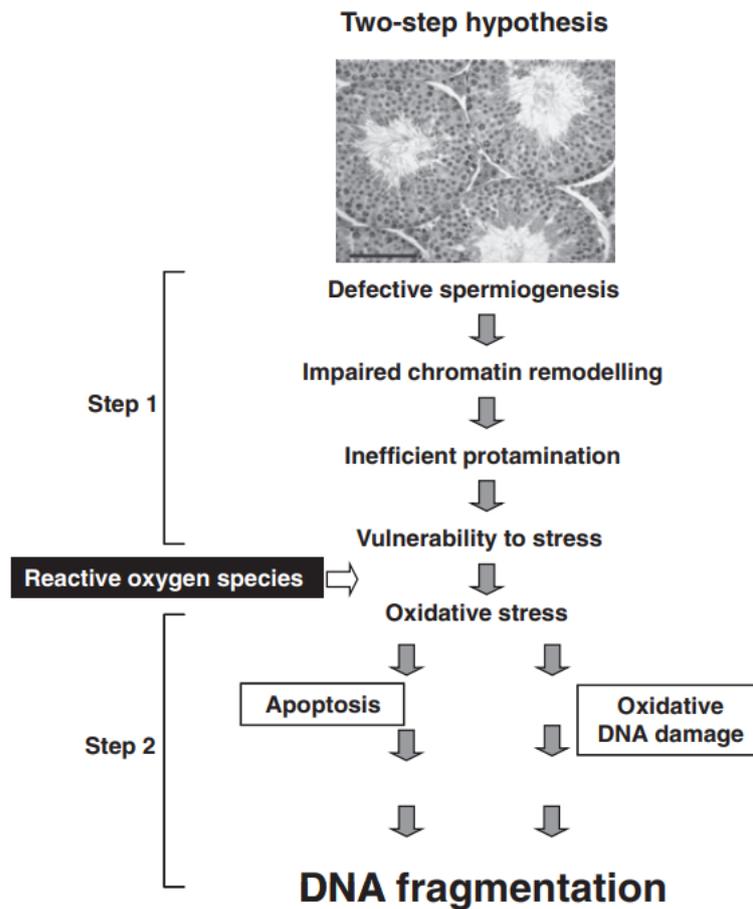


Figure 2 A two-step hypothesis of DNA damage in the male germ line.

Figura 3 [12].

Los espermatozoides con pobre morfología están considerados como generadores de cantidades excesivas de ROS y producen un exceso de citoplasma residual (ERC), parámetro a tener en cuenta en el análisis de la morfología espermática, lo que se traduce en una disminución de la fertilidad masculina [2].

Como hemos mencionado anteriormente, la elevada producción de ROS por espermatozoides puede ser causado también por una disrupción en el flujo de transporte de electrones en la mitocondria que, de hecho, esta estimulado por un contenido anormalmente alto de ácidos grasos en espermatozoides con morfología anormal [2]. Este daño oxidativo puede provocar SDF de manera indirecta induciendo apoptosis en un gran número de espermatozoides y por tanto un mayor porcentaje de ellos que escapan de ese proceso y que aparecen en el eyaculado (apoptosis abortiva), o de manera directa.

Como hemos comentado al principio de este apartado, hay unos factores clínicos (edad, infección, cáncer, desequilibrios hormonales, obesidad, diabetes, ...) y ambientales (calor exposición, toxinas ambientales, radiación, tabaquismo, abuso de drogas, dieta, ...) que también pueden estar implicados en el SDF.

La edad paterna es un poderoso factor de riesgo de daño al ADN en el espermatozoide. Este hallazgo se basa en resultados de estudios en los que se han utilizado distintos protocolos de evaluación de daños en el ADN mostrando una correlación positiva entre la edad paterna y el daño en el ADN espermático en humanos [10]. Por tanto, el SDF aumenta con la edad, comenzando en edad reproductiva y duplicándose entre los 20 y 60 años. Esta asociación se ha atribuido a una mayor exposición a OS, condensación defectuosa de la cromatina espermática, y apoptosis abortiva que ocurre con envejecimiento. Cuadros clínicos asociados con aumento de SDF incluyen, varicocele, que induce daño testicular y SDF a través del aumento de la temperatura intratesticular y flujo retrógrado de metabolitos renales y suprarrenales resultando en OS y apoptosis [6].

Las infecciones genitourinarias y el posterior aumento de leucocitospermia incrementa la producción de ROS y como consecuencia el aumento de SDF. Estas causas de infertilidad masculina debido al estrés oxidativo son potencialmente corregibles y representan hasta el 35% de los pacientes que consultan por infertilidad. Estas condiciones, que pueden infligir daños a las células germinales masculinas, pueden desencadenarse por la acción directa de patógenos o indirectamente al inducir procesos inflamatorios en el tracto seminal mediante la activación de leucocitos [2].

Se ha demostrado que la integridad del ADN de los espermatozoides se ve afectada significativamente en muestras de semen con leucocitospermia. Como consecuencia, los niveles de ROS y citocinas aumentan en el plasma seminal y ejercen sus efectos perjudiciales, destacando el daño al ADN espermático [9].

Se demostró que, en los pacientes infértiles, el hallazgo de niveles elevados de ROS en el plasma seminal está asociado con una escasa capacidad antioxidante. Esto fortalece el hecho de que el equilibrio entre la generación de ROS y la capacidad antioxidante del semen juegan un papel muy importante en la fisiopatología de las infecciones/inflamaciones del tracto genital y su impacto en las funciones del espermatozoide y por lo tanto en la capacidad fecundante. Considerando que los leucocitos, como parte de sus funciones fisiológicas, producen peróxido

de hidrógeno, las ROS derivadas de ellos durante procesos inflamatorios o infecciosos pueden aumentar el daño al ADN [9].

Un estudio reciente demostró que los leucocitos seminales no solo están significativamente asociados con la producción de ROS en el semen, sino también con la producción de superóxido por parte de las células germinales masculinas, activación de determinadas caspasas en los espermatozoides y el aumento del porcentaje de espermatozoides con un potencial de membrana mitocondrial alterado. Las caspasas 3 y 7 juegan un papel fundamental en la apoptosis y considerando que en las muestras seminales con leucocitospermia hay una excesiva producción de ROS, es concebible que esos ROS derivados de leucocitos puedan inducir la apoptosis mediante la activación de las caspasas mencionadas. Además, se ha demostrado una correlación positiva entre la producción de ROS en el eyaculado y las caspasas 3 y 9 [2].

Con respecto a los ROS, hay que diferenciar donde se originan. Pueden producirse de una forma externa como es a través de los leucocitos en el eyaculado o por los propios espermatozoides durante la respiración celular.

Los ROS producidos extrínsecamente, es decir, por los leucocitos, afectan predominantemente a la membrana plasmática y está relacionada con una disminución de la movilidad del espermatozoide. Sin embargo, los ROS producidos intrínsecamente (espermatozoides) causan predominantemente daño en el ADN [9]. La respiración aerobia no es un mecanismo perfectamente eficiente y aproximadamente entre 1-5 % del oxígeno consumido es convertido en radicales libres, por lo tanto, los espermatozoides son importantes productores de ROS [2].

También se produce un incremento de SDF en hombres con cáncer testicular y otras neoplasias malignas, y sugieren que es un efecto secundario a las alteraciones endocrinas o aumento de OS en estas patologías [6].

El aumento de la temperatura escrotal, el desequilibrio endocrino y la inflamación sistémica crónica se cree que son mecanismos que relacionan la obesidad con alteraciones en la función de los espermatozoides y con su reducción en su potencial de fertilidad. De hecho, los estudios han mostrado una mejora significativa en la SDF y en general de la fertilidad con la pérdida de peso [3]. Hombres con diabetes presentan niveles más altos de SDF debido al OS. Se puede producir un aumento de la temperatura escrotal por anomalías físicas como criptorquidia, testículos retráctiles y varicocele, así como en casos febriles agudos y estilos de vida sedentarios [6].

Algunos estudios demuestran un aumento de SDF debido a la exposición a aire contaminado. La exposición a metales pesados como plomo, cadmio, fenvalerato (insecticida sintético) y pesticidas organofosforados pueden causar daño al ADN. También fumar tiene un impacto negativo en la integridad del ADN debido a metabolitos del tabaco como la nicotina, cadmio, plomo y benzopireno. El efecto de las toxinas depende de proximidad y duración de la exposición [6].

En un estudio reciente [5] se planteó la hipótesis de que los hombres que son homocigóticos nulos para el gen de la glutatión-S-transferasa M1 son menos capaces de eliminar metabolitos reactivos de hidrocarburos aromáticos policíclicos cancerígenos que se encuentran en el aire contaminado. En consecuencia, estos hombres son más susceptibles a los efectos de la contaminación del aire sobre la cromatina de los espermatozoides. Diseñaron un estudio longitudinal en el que los hombres proporcionaron muestras de semen durante períodos de baja y alta contaminación del aire, y encontraron una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo nulo de glutatión-S-transferasa M1 y el aumento de SDF. Además, los hombres con este genotipo también mostraron niveles más altos de SDF en respuesta a la exposición a la contaminación del aire intermitente.

Ondas electromagnéticas, particularmente de teléfonos celulares, aumentan la producción de ROS mitocondriales y la formación de aductos de ADN que causan daño a éste [2].

Los tratamientos de quimioterapia y la radioterapia también pueden provocar la inducción de SDF. En general, se cree que los tratamientos contra el cáncer afectan la fertilidad masculina y que la reducción de la producción de espermatozoides surge de los efectos citotóxicos de la quimioterapia o la radioterapia sobre el epitelio seminífero. Aunque los tests específicos para el análisis del ADN espermático han sido limitados en pacientes con cáncer, observaron que la integridad y compactación del ADN espermático estaban afectados en pacientes con cáncer de testículo y linfoma de Hodgkin antes de la quimioterapia [5].

Estos factores de riesgo clínicos y ambientales aumentan la producción de ROS por diferentes mecanismos que conducen a OS y, en última instancia, a SDF.

El daño al ADN se traduce en la fragmentación del mismo. La fragmentación del ADN se caracteriza por roturas de cadena simple (SSB) y roturas de doble cadena (DSB). En el ADN con SSB, la otra hebra puede actuar como plantilla para la replicación y, por lo tanto, puede repararse. Cuando estas lesiones no se reparan, pueden comprometer la integridad del genoma. Los SSB son causados por acción de la actividad abortiva de la topoisomerasa o la ADN ligasa

adyacente a una lesión. Además, el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica y la alteración de proteínas también puede conducir a SSB.

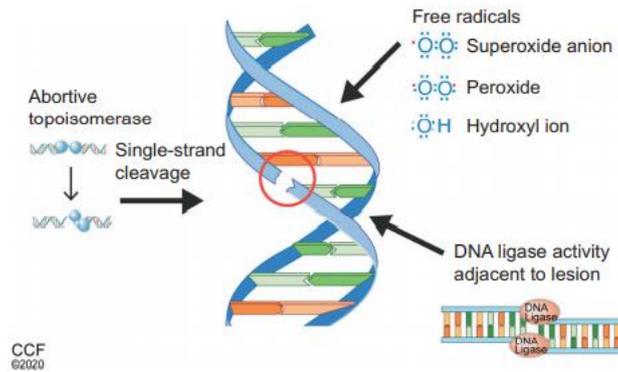


Figura 4 [6].

En general, los DSB se consideran dañinos para el ADN genómico ya que dan lugar a reordenamientos genéticos. Estas roturas se pueden producir a partir de fuentes endógenas como consecuencia de los SSB durante el proceso de replicación del ADN, horquillas de replicación colapsadas o niveles aumentados de radicales libres. Además, factores exógenos como radiaciones, productos químicos genotóxicos o determinados fármacos también pueden provocar DSB [6].

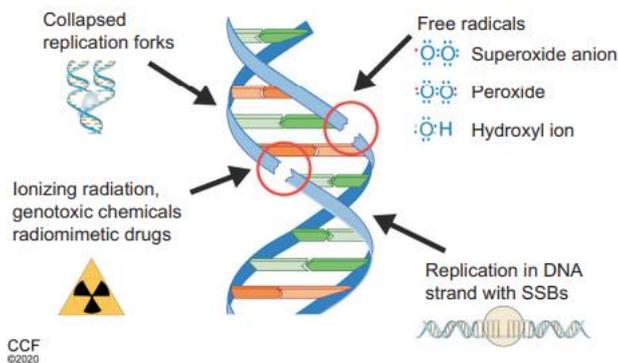


Figura 5 [6].

Tanto los SSB como los DSB presentes en el ADN del espermatozoide pueden afectar la fertilidad y los resultados reproductivos.

Los DSB afectan negativamente la cinética embrionaria y las tasas de implantación, y se han asociado con abortos espontáneos en parejas sin factor femenino. Por el contrario, las SSB no tienen un impacto significativo en el desarrollo del embrión o en las tasas de implantación [11].

Debido a estos datos, es imprescindible realizar una correcta medición de SSB y DSB ya que puede proporcionar información importante durante evaluación de la fertilidad de los hombres. La integridad del ADN de los espermatozoides se puede determinar realizando el ensayo TUNEL, por ejemplo, y también mediante otras pruebas directas como SCSA y SCD, las cuales serán profundizadas más adelante. Sin embargo, estos ensayos no pueden distinguir entre SSB y DSB presentes en el ADN [11].

6.1 TÉCNICAS DIAGNÓSTICO

❖ Ensayo TUNEL.

En este test diagnóstico, las roturas del ADN monocatenario y bicatenario marcan con tiocianato de fluoresceína (FITC)-dUTP antes de que la muestra se someta a análisis microscópico de fluorescencia o a citometría de flujo. Por lo tanto, si hay muchas roturas en el ADN, se unirá más FITC-dUTP aumentando el número de células fluorescentes y por lo tanto aumentando la intensidad de la señal fluorescente. Por último, se observa en un microscopio fluorescente o se mide mediante citometría de flujo [3].

En los laboratorios de infertilidad masculina se utiliza ampliamente este ensayo para medir el SDF, y el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado se correlaciona negativamente con la morfología, motilidad y concentración de los espermatozoides.

Su alto valor predictivo permite confirmar que los hombres infértiles con resultado TUNEL positivo realmente tienen niveles de SDF anormales que pueden ser la causa de su infertilidad [3].

Como cualquier método, el ensayo TUNEL tiene sus ventajas y desventajas. Generalmente, el procedimiento del ensayo requiere mucho tiempo y laborioso. La citometría de flujo está ampliamente automatizada, y se pueden medir 10,000 células en un corto período de tiempo, lo que resulta en una mayor precisión. Por otro lado, un citómetro de flujo es caro y puede no estar al alcance de muchos laboratorios. Los resultados son también influidos significativamente por el tipo de fijación utilizada, tiempo de incubación y el fluorocromo utilizado [3]

❖ Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD).

La prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD) analiza la formación de halos resultantes de la liberación de bucles de ADN después de la desnaturalización del mismo. Estos

halos surgen después de tratar muestras de esperma en un gel de agarosa con una solución ácida y tampón de lisis. Se produce un halo pequeño si el ADN está poco fragmentado, o no se produce halo si el ADN del esperma está muy fragmentado. Por el contrario, si el ADN está intacto, el ADN en bucle si genera un halo de mayor tamaño. Los halos se pueden observar usando un microscopio de campo brillante o de fluorescencia [3].

Las ventajas de la prueba SCD son: rapidez, el protocolo es fácil de realizar y los resultados son moderados, pero correlacionados con SCSPA y TUNEL y se ha utilizado con éxito en estudios clínicos gracias a su buen poder predictivo para la fecundación y el embarazo después FIV e ICSI.

❖ Ensayo Comet.

Este procedimiento se basa en los principios permeabilidad y movimiento electroforético del ADN fragmentado. La apariencia característica de “cometa” es de los fragmentos de ADN desenrollados que forman una cola después del movimiento electroforético en el gel de agarosa. Por otro lado, el ADN no fragmentado permanece en la cabeza del “cometa”. El daño del ADN se cuantifica mediante la medición del desplazamiento entre el material genético nuclear (cabeza del cometa) y el migrado de la cola de ADN desenrollada. La longitud de esta cola sirve como índice de daño al ADN espermático. El “momento de la cola” o momento de torsión de la cola se obtiene multiplicando la longitud de la cola con la fracción del ADN total en éstas cuando se visualiza usando un tinte de unión fluorescente al ADN. La mayoría de los test SDF no detectan ni diferencian simultáneamente entre las roturas de cadena simple (ssDNA) y doble cadena (dsDNA) en el mismo espermatozoide, mientras que el ensayo Comet representa una excepción [3].

El ensayo Comet puede evaluar eficazmente el daño del ADN de los espermatozoides después de su criopreservación y sus resultados predicen el desarrollo embrionario, principalmente en casos de esterilidad idiopática.

❖ Medición de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG).

8-OHdG es uno de los marcadores más sensibles para indicar daño oxidativo al ADN. En condiciones fisiológicas este daño es reversible y puede ser reparado por el ovocito después de la fecundación o por el embrión durante su desarrollo, sin embargo, grandes cantidades de 8-OHdG han sido relacionados con la infertilidad masculina. Si este daño no es reparado, esta

molécula puede ser mutagénica y puede provocar la pérdida del embrión, malformaciones o cáncer [2].

Esta molécula es un subproducto de daño oxidativo del ADN espermático y debido a su potente mutagenicidad es uno de los marcadores de daño al ADN espermático más estudiados [3].

Para la detección de 8-OHdG se puede utilizar la microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

La medición de 8-OHdG puede distinguir con éxito entre hombres fértiles e infértiles, y los resultados han demostrado que la cantidad de esta molécula se correlaciona positivamente con el SDF evaluado por el ensayo TUNEL [3].

Según los informes, los niveles de 8-OHdG son más altos en fumadores y en pacientes infértiles con varicocele, y debido a su potente mutagenicidad, niveles muy elevados de 8-OHdG se han asociado con abortos espontáneos, malformaciones fetales o incluso cáncer infantil [3].

❖ Ensayo de la Estructura de la Cromatina Espermática (SCSA).

El SCSA es un test en el que se utiliza citometría de flujo y se basa en el hecho de que la cromatina espermática anormal es muy susceptible a efectos físicos inducidos por la desnaturalización parcial del ADN “in situ”. El parámetro más importante de la SCSA es el índice de fragmentación del ADN (% DFI), que representa la población de células con daño en el ADN [8].

Este ensayo está basado en las propiedades metacromáticas del test naranja de acridina con la diferencia de que se utiliza un citómetro de flujo en lugar de un microscopio de fluorescencia [3].

❖ Medición naranja de Acridina (Acridine Orange, AO).

La prueba de naranja de acridina se introdujo como un método simplificado del SCSA en el que se utiliza un microscopio de fluorescencia y no requiere costosos equipos de citometría de flujo y personal capacitado como en SCSA. [8]

Es un fluorocromo que mide la susceptibilidad a la desnaturalización del ADN nuclear de los espermatozoides. Éste se intercala y dependiendo a qué tipo de ADN se una, se observa fluorescencia verde indicando que se ha unido dsDNA (sin daño en el ADN) o fluorescencia roja, indicando que se ha unido a ssDNA que significaría que el ADN está fragmentado. Los estudios muestran que los hombres infértiles tienen un porcentaje significativamente mayor de

espermatozoides AO positivos que los controles de hombre fértiles, y que los hombres con varicocele tienen significativamente más espermatozoides AO positivos que el grupo infértil [3].

La varicocelectomía dio lugar a una mejora significativa en la integridad del ADN, lo que demuestra la utilidad clínica de la tinción AO [3].

❖ Ensayo de Cromomicina A3 (CMA3).

CMA3 es un glucósido producido por una cepa específica de la bacteria *Streptomyces griseus* que, en presencia de Mg^{2+} , se une al ADN, donde compete específicamente por los sitios de unión de protamina a través del surco menor del ADN, lo que indica una deficiencia de protamina en espermatozoides CMA3-positivos mientras que los CMA3-negativos (que se tiñen de un amarillo tenue o de un verde opaco) indican un elevado porcentaje de protaminas unidas al ADN [3].

❖ Tinción azul de Toluidina (TB).

Tinción que se une específicamente a los componentes celulares ácidos. Este tinte se muestra una elevada afinidad por la unión al residuo de fosfato del ADN espermático inmaduro. Las cabezas de los espermatozoides con integridad normal del ADN se tiñen de azul, mientras que las cabezas de los espermatozoides con ADN dañado están teñidas de violeta. El método es simple y utiliza tintes comunes y rentables. Los resultados también se correlacionan con pruebas avanzadas como SCSA y TUNEL [3].

❖ Tinción azul de Anilina (AB).

Permite determinar la capacidad de condensación de la cromatina espermática utilizando un tinte ácido con alta afinidad por las histonas ricas en lisina que no son intercambiadas por protaminas durante la espermatogénesis [3].

6.2 MEDIDAS TERAPÉUTICAS

❖ Aislamiento selectivo de espermatozoides mediante gradientes de densidad, columnas de lana de vidrio, swim-up, separación electroforética, sistemas de microfluidos.

La estrategia a corto plazo sería desarrollar técnicas para aislar solo aquellos espermatozoides que poseen bajos porcentajes de daño en el ADN para fines de reproducción asistida. La gran

mayoría de las clínicas de reproducción asistida realizan una de las siguientes técnicas para aislar espermatozoides funcionalmente normales: swim-up, que separa la muestra en dos fracciones, móviles y no móviles o la centrifugación en gradiente de densidad que separa espermatozoides según su densidad y facilita la separación y selección de los espermatozoides móviles y morfológicamente normales [13].

Recientemente se ha demostrado que la adición de ácido ascórbico a los medios durante un procedimiento de swim-up podría reducir el porcentaje de espermatozoides con elevados niveles de ROS y mejorar integridad de la cromatina, a su vez, también se ha demostrado que la vitamina E preserva la integridad funcional de los espermatozoides durante su aislamiento [10].

Otro método menos utilizado y que parece ser eficaz para aislar espermatozoides normales, es la filtración a través de columnas de lana de vidrio [12].

Recientemente, se ha desarrollado una técnica electroforética que es capaz de aislar espermatozoides que posean niveles bajos de daño en el ADN. Esta técnica también es eficaz con materiales de partida más sensibles como biopsias testiculares e incluso suspensiones de esperma congeladas. Además, la eficacia de este método se ha demostrado en estudios de casos en los que otros métodos han sido ineficaces para aislar espermatozoides que sean capaces de fecundar y que se produzca un inicio normal del desarrollo embrionario [12].

Hoy en día hay métodos novedosos para aislar selectivamente espermatozoides como los sistemas de microfluidos.

En estudios que utilizaron esta tecnología de microfluidos para la separación de espermatozoides móviles, las muestras de semen se depositaron en un dispositivo que permitía la separación gracias a la fuerza de la gravedad donde la presión hidrostática de dos depósitos de entrada separados condujo el flujo de medios por un canal de microfluidos convergente. El principio del dispositivo aprovechó el hecho que solo los espermatozoides móviles pueden atravesar el borde que separa las corrientes paralelas de semen diluido y medio fresco. Por lo tanto, los espermatozoides móviles serían capaces de nadar lejos de los espermatozoides inmóviles, debris y el plasma seminal y acumularse en un depósito [19]. Los espermatozoides sin fragmentación de doble cadena de ADN presentan una motilidad característica que les permite alcanzar antes la cámara de mayor tamaño donde se recogerán seleccionados tras media hora de incubación. Esta indicado en pacientes que presentan fragmentación del ADN espermático.

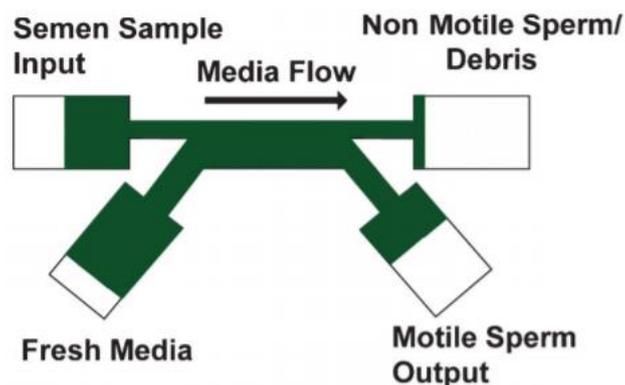


Figura 6 [19].

❖ Criopreservación espermática.

Otra posible solución, particularmente al daño del ADN asociado con la edad o la exposición a agentes quimioterapéuticos, sería considerar crioconservar los espermatozoides a una edad temprana o antes del tratamiento quimioterapéutico. El principal problema de esta estrategia es los métodos que se utilizan actualmente para criopreservar espermatozoides humanos inducen daño oxidativo en el ADN [10]. La adición de antioxidantes puede mejorar dicho daño independientemente de si se trata de criopreservación o vitrificación.

❖ Prescripción de antioxidantes.

Los antioxidantes juegan un papel importante en la salud al eliminar el exceso de radicales libres y, por lo tanto, prevenir el daño oxidativo a las macromoléculas [6]. El líquido seminal es una fuente importante de antioxidantes (ROS “scavengers”) y es clave para proteger los espermatozoides del daño oxidativo. Los estudios demuestran que una deficiencia de antioxidantes en el semen está asociada con daño en el ADN de los espermatozoides. Del mismo modo, algunos estudios han encontrado que la actividad antioxidante seminal es reducida en hombres infértiles con altos niveles de ROS [14]. Por ello, un enfoque terapéutico potencial es intentar contrarrestar el estrés oxidativo responsable del daño del ADN en la línea germinal masculina mediante la administración exógena de antioxidantes [12].

Un estudio [1] demostró que la administración de L-Carnitina (LC), en los procesos de aislamiento selectiva, fue beneficiosa y mejora la motilidad de los espermatozoides, en particular, después de las 2 horas período de incubación. Se observó un aumento significativo en la motilidad de los espermatozoides centrifugados suplementados con LC en comparación con el control. La propiedad de LC como ROS “scavenger” podría ser responsable de su efecto positivo sobre la motilidad de los espermatozoides, así como un aumento de la actividad antioxidante seminal.

❖ Administración de antibióticos.

Como hemos mencionado anteriormente en caso de que haya una infección y como consecuencia se produzca una leucocitospermia, conllevaría a aumentar los niveles de OS y por tanto de SDF.

La contaminación bacteriana de los eyaculados se ha convertido en un factor esencial que contribuye a la degradación excesiva de los espermatozoides en las clínicas de reproducción asistida. Se ha observado adherencia bacteriana a la superficie de los gametos masculinos seguida de aglutinación de los espermatozoides, pérdida de motilidad y una reacción acrosómica alterada en cultivos de esperma con bacterias. Además, se ha informado de que el uso de suspensiones de esperma contaminadas puede provocar la degeneración de los ovocitos y la transmisión de infecciones a los receptores [18].

Las ventajas de complementar los antibióticos con los diluyentes de semen han sido cuestionadas. A pesar de la capacidad de los antibióticos para prevenir la bacteriospermia, han surgido informes que hacen hincapié en los efectos potencialmente tóxicos de los antibióticos tradicionales sobre la vitalidad del esperma y del embrión. Estos hallazgos, junto con una resistencia bacteriana creciente a los antibióticos, han contribuido a la necesidad de encontrar alternativas para reducir su uso generalizado durante la manipulación del semen [18].

Debido a lo descrito anteriormente, un estudio [18] utilizó un sistema novedoso, el plasma no térmico (NTP), con la capacidad de lograr una alta eficiencia en la inactivación microbiana sin aumentar la temperatura del gas y que, teóricamente, podría usarse como reemplazo de los antibióticos para el tratamiento del semen. Además, los estudios preliminares sugieren que el NTP podría usarse para estimular la motilidad de los espermatozoides de pacientes astenozoospermicos.

❖ Varicocelelectomía.

El varicocele consiste en una dilatación de las venas que drenan la sangre de los testículos este hecho aumenta la temperatura en los testículos y en los epidídimos. Los testículos están fuera de la cavidad abdominal para tener de 2 a 3 grados menos. Por eso un aumento de temperatura puede ser crítico en la producción y maduración de los espermatozoides.

El varicocele se ha asociado con un aumento de los niveles de SDF. Esto es debido a que este problema produce un aumento de la temperatura escrotal dando lugar a daño espermatogénico [2].

Se ha establecido que la varicocelectomía puede mejorar la espermiogénesis y reducir los niveles de SDF. Además, este tratamiento ha demostrado mejorar el éxito del embarazo tanto en concepción natural como en reproducción asistida. Dadas estas observaciones, la asociación entre varicocele y el SDF está contrastada, y la varicocelectomía es una opción que se les propone a los pacientes para mejorar la fertilidad [6].

❖ Modificaciones del estilo de vida.

Exposición a factores ambientales y un mal estilo de vida tienen implicaciones negativas sobre la fertilidad masculina. Los datos actuales han asociado el tabaquismo con niveles de SDF más altos en comparación con los no fumadores, sin embargo, ningún estudio ha evaluado aún el posible impacto positivo de dejar de fumar en SDF. Hay también numerosos factores ambientales como el aire contaminado, radiaciones ionizantes y pesticidas, vinculados con niveles aumentados de SDF. Varios son los estudios que han demostrado un nivel de SDF más alto en hombres obesos, sin embargo, un metaanálisis reciente no encontró una asociación sólida entre IMC y SDF. No hay evidencia concreta en que la modificación del estilo de vida mejore definitivamente los niveles de SDF, sin embargo, se ha propuesto que la pérdida de peso y los cambios en la dieta mejoran los índices de SDF en los pacientes [6].

Además, hay evidencia de que los hombres infértiles con estilos de vida específicos también pueden estar en riesgo de deficiencia de antioxidantes o vitaminas (por ejemplo, fumar, aumento ingesta de alcohol o mala dieta) provocando un desequilibrio entre ROS y antioxidantes y como consecuencia aumentando los niveles de SDF [14].

❖ Abstinencia reducida.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un período de abstinencia de 2 a 7 días antes de tomar la muestra para la evaluación estándar del semen. Los períodos prolongados de abstinencia están asociados con niveles más altos de daño en el ADN del esperma, sin embargo, estudios recientes han sugerido que la abstinencia más corta es mejor que la abstinencia recomendada por la OMS para realizar análisis seminal. El período de abstinencia es importante para asegurar tanto la cantidad como la calidad de los espermatozoides, necesarios para una concepción exitosa ya sea natural o asistida [16]. La abstinencia prolongada conduce a la acumulación de espermatozoides en el epidídimo y puede aumentar su exposición a los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) provocando daño al ADN espermático y como consecuencia aumentando los niveles de SDF.

En términos de fertilidad, se ha demostrado que un intervalo de abstinencia de 3 días o menos se asocia con mayores tasas de embarazo después de la IIU (Inseminación Intrauterina), también se demostró que el uso de un segundo eyaculado (producido 1 hora después de una muestra inicial) se asoció con mayores tasas de euploidía de blastocisto (43,6 % frente a 27,5 %), así como un mayor porcentaje de espermatozoides con buena cromatina [10].

En un estudio prospectivo realizado a varones normozoospermicos que realizaron un periodo de abstinencia de 24 horas y en el que no se realizó ningún método de selección espermática se observó una reducción de SDF de hasta un 25 % [15]. A pesar de que el estudio se realizó en varones con parámetros seminales normales, en base a los resultados obtenidos se recomienda que aquellos varones con niveles elevados de SDF y factor masculino severo recojan muestras seminales después de 1 día de abstinencia, mejorando así el porcentaje de SDF.

Hay cierta controversia con los efectos del período de abstinencia sobre la calidad del semen, sin embargo, en un estudio encontraron una correlación positiva y significativa entre la duración de la abstinencia sexual y la fragmentación del ADN de los espermatozoides [16].

❖ MACS.

Como bien sabemos uno de los primeros marcadores de apoptosis es la pérdida de la integridad de la membrana, que conduce a la externalización de la fosfatidilserina (una molécula con una alta afinidad por la anexina V). Por lo tanto, la anexina V (utilizada como marcador de espermatozoides apoptóticos) conjugada con microesferas magnéticas, que están expuestas a un campo magnético en una columna de afinidad, puede separar los espermatozoides apoptóticos de los no apoptóticos.

Muchos estudios han evaluado recientemente el uso de MACS como método para reducir la apoptosis de los espermatozoides y mejorar la calidad de los espermatozoides y como consecuencia mejorar el desarrollo de los embriones. En base a estos estudios, otros grupos estudiaron MACS como un método de selección de espermatozoides para la realización de TRA. Estudios recientes han recomendado la selección por MACS independientemente de los resultados de la fragmentación del ADN porque los espermatozoides apoptóticos no se asocian exclusivamente con la fragmentación del ADN de los espermatozoides [17].

❖ IMSI.

Se denomina inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente y se utiliza un gran aumento para seleccionar los espermatozoides

morfológicamente normales ya que se puede observar la presencia de vacuolas y éstas están relacionadas con SDF por lo que a la hora de microinyectar seleccionaríamos espermatozoides sin vacuolas [6]. Un estudio reciente [5] indica que los niveles de fragmentación del ADN, según la evaluación de la prueba SCD, en los espermatozoides seleccionados por IMSI, es insignificante.

❖ PICS

Esta técnica se basa en que, en el tracto genital femenino, el ácido hialurónico juega un papel esencial en la selección de los espermatozoides más competentes para la fecundación. La cabeza del espermatozoide que ha completado la espermatogénesis, posee receptores para el ácido hialurónico, de tal manera que el espermatozoide maduro se unirá a dicha molécula. Dichos espermatozoides muestran menores niveles de fragmentación de ADN espermático y de marcadores apoptóticos

Este sistema de selección espermática consiste en una placa, en la cual hay unas regiones enriquecidas de ácido hialurónico, sobre las cuales se realiza la inseminación del semen capacitado. El espermatozoide con receptor para el ácido hialurónico, se adhiere y se selecciona por tanto positivamente. La selección del espermatozoide se realiza con la pipeta de microinyección cogiendo aquellos espermatozoides adheridos.

❖ Microscopía con luz polarizada.

Este método ha sido propuesto como una herramienta novedosa para la selección de espermatozoides y consiste en evaluar la organización de los orgánulos en ambos compartimentos de la cabeza del espermatozoide, el núcleo y el acrosoma, y también la organización en la cola, mediante la aplicación de microscopía de luz polarizada adaptada a la técnica ICSI. Este enfoque se basó en las características birrefringentes de los espermatozoides. En el núcleo del espermatozoide maduro, hay una fuerte birrefringencia asociada con filamentos de nucleoproteínas que están ordenados y orientados longitudinalmente. La presencia de filamentos de proteínas subacrosomales que están orientados longitudinalmente proporciona al complejo acrosómico maduro un tipo similar de birrefringencia. Lo mismo es para grandes porciones de la cola, en las que la organización microtubular del axonema en la pieza intermedia son birrefringentes. La principal ventaja es la posibilidad de seleccionar espermatozoides birrefringentes para ICSI sin afectar su vitalidad o motilidad [20].

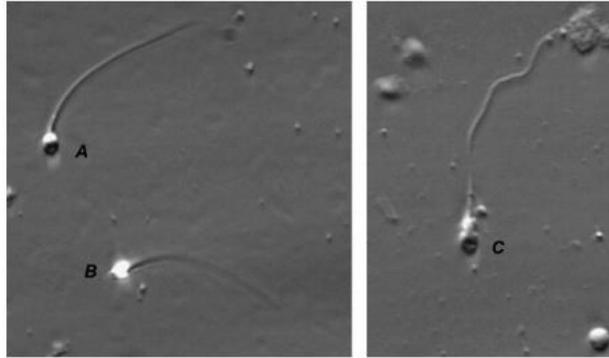


Figura 7. El acrosoma reacciona en el espermatozoide A y no reacciona en los espermatozoide B. El espermatozoide C carece de birrefringencia debido a la ausencia de una textura convencional, con una vacuola en su cabeza. Solo los núcleos no picnóticos (aquellos que no presentan condensación irreversible de la cromatina) pueden ser birrefringentes, debido a la organización de los filamentos de las nucleoproteínas, estrictamente empaquetados en una textura muy compacta [20].

❖ Obtención de espermatozoides a través de biopsia testicular.

Los espermatozoides extraídos de los testículos de hombres con altos niveles de SDF en el eyaculado tienden a tener mejor calidad del ADN. El fundamento de este método es evitar la fragmentación del ADN post- testicular causada por el estrés oxidativo durante la maduración de los espermatozoides a través del epidídimo. Por lo tanto, la fecundación de ovocitos por espermatozoides testiculares genómicamente intactos, aumenta las posibilidades de crear un embrión genéticamente normal y la probabilidad de lograr un recién nacido vivo.

7 DISCUSIÓN

En esta revisión bibliográfica se ha realizado una búsqueda exhaustiva de diferentes artículos de distintas revistas y sitios de publicación en los que se ha intentado recopilar la máxima información posible acerca de la enfermedad fragmentación de ADN espermático (SDF).

En esta búsqueda he analizado diferentes artículos que describen distintos aspectos de esta enfermedad.

Desde mi punto de vista, esta enfermedad está muy estudiada hoy en día y hay mucha información en diversas fuentes científicas como PubMed por lo que en este sentido ha sido relativamente fácil encontrar la información correspondiente para realizar una revisión completa de los distintos aspectos de la enfermedad dentro de los límites de espacio del trabajo.

Uno de los puntos que me gustaría recalcar, es que he encontrado cierta controversia, sobre todo en el apartado de métodos diagnósticos de la enfermedad. Aquí diferentes artículos e investigaciones utilizaban distintos métodos. Desde mi punto de vista cada uno de ellos tiene sus puntos fuertes y débiles, como he descrito anteriormente, pero creo que sería positivo unificar criterios e intentar establecer un método estándar que sea asequible en cualquier laboratorio y así poder obtener resultados más concretos.

Otro aspecto a tener en cuenta, es el apartado de medidas terapéuticas. Aquí también he encontrado controversia sobre que tratamiento es el óptimo para reducir los niveles de SDF. Uno de los tratamientos descritos es la administración de antibióticos para evitar la infección y la leucocitospermia evitando así el aumento de ROS, pero esto según estudios [18] no es del todo recomendable por el hecho de la resistencia de las bacterias a los antibióticos por ello aquí se estudia el efecto de otro tratamiento que no conlleva ese problema, el NTP. Sin embargo, el tratamiento a corto plazo y que parece ser el estándar en la mayoría de los laboratorios de reproducción asistida es el aislamiento selectivo de espermatozoides.

8 CONCLUSIONES

Como conclusión de este trabajo, destacar que a pesar de que se ha investigado mucho acerca de esta enfermedad sigue habiendo un gran número de casos. Esto es en gran parte a la desinformación que hay entre los jóvenes acerca de las causas de esta enfermedad y de la repercusión negativa en su fertilidad.

La infertilidad masculina es una patología que muestra una gran incidencia en la actualidad y las previsiones es que dicha incidencia vaya aumentando progresivamente en los próximos años. Un porcentaje bastante elevado de la infertilidad masculina es debida a los efectos deletéreos producidos por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y estas producen, entre otros efectos, niveles de fragmentación elevados que pueden tener graves consecuencias tanto a la hora de obtener un recién nacido vivo (fallos de fecundación, fallos de implantación, abortos de reptición, ...) como en la salud del mismo.

Una gran parte de los pacientes presenta esta condición debido a factores relacionados con el estilo de vida como hemos visto en esta revisión. Esto es algo que se podría cambiar en esta sociedad mediante una buena estrategia de comunicación ya sea por televisión o, mediante una herramienta muy utilizada hoy en día, las redes sociales.

También, destacar que el hecho de ser diagnosticado con esta enfermedad y no poder tener hijos de forma natural presenta un efecto psicológico no solo en el varón sino también en su pareja. Tener que recurrir a TRA y en determinadas ocasiones recurrir a donantes hace que el proceso de tener hijos sea un camino duro emocionalmente para la pareja.

Por todo ello es necesario intentar informar a la población de los efectos negativos de un estilo de vida poco saludable.

Hay métodos terapéuticos novedosos y esperanzadores para aquellos pacientes con SDF que quieren tener hijos de forma natural. Algunos de ellos se han comentado en esta revisión como el IMSI, PICSI, microscopía de luz polarizada o selección espermática mediante sistemas de microfluidos. Todos estos avances arrojan luz en aquellas parejas con factor masculino severo que quieren tener un recién nacido vivo en casa.

Son muchos los estudios que en los últimos años se han centrado en la fragmentación del ADN espermático, tanto a nivel diagnóstico (búsqueda de los métodos más eficaces para su diagnóstico) como a nivel de tratamiento (métodos de selección más eficientes, tratamientos farmacológicos o cambio en los estilos de vida). Hoy en día no existe ningún método concreto de elección a la hora de afrontar dicha patología y los métodos utilizados van a depender fundamentalmente de la tecnología disponible en cada unidad de medicina reproductiva por ello considero necesario seguir investigando nuevos métodos así como desarrollar ensayos clínicos controlados y aleatorizados en búsqueda de los métodos tanto diagnósticos como terapéuticos que nos permitan afrontar con éxito dicha patología.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Banihani S., Sharma R., Bayachou M., Sabanegh E. and Agarwal A. Human sperm DNA oxidation, motility and viability in the presence of L-carnitine during in vitro incubation and centrifugation. *Andrologia* 2012 May;44 Suppl 1:505-12.
2. Henkel R. R. and Franken Daniel R. Sperm DNA fragmentation: Origin and impact on human reproduction. *J Reprod Stem Cell Biotechnol* 2(2):88-108.
3. Dutta S., Henkel R. and Agarwal A. Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation. *Andrologia*. 2020; 00:e13718.

4. Ten J., Guerrero J., Linares A., Rodríguez-Arnedo A., Morales R, Lledó B., Llácer J. and Bernabeu R. Sperm DNA fragmentation on the day of fertilisation is not associated with assisted reproductive technique outcome independently of gamete quality. *Hum Fertil (Camb)* 2021 Jan 27; 1-17.
5. Sakkas D., and Álvarez J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and análisis. *Fertil Steril* 2010 Mar 1;93(4):1027-36.
6. Agarwal A., Majzoub A., Baskaran S., ... Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *World J Mens Health* 2020 Oct; 38(4):412-471.
7. Agarwal A, Cho C.L., Majzoub A., Esteves S.C. The Society for Translational Medicine: clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility. *Transl Androl Urol* 2017; 6(Suppl 4):S720-33.
8. Agarwal A. and Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* Jul-Aug 2003; 9(4):331-45.
9. Henkel R. R., Kierspel E., Stalf T., Mehnert C., Menkveld R., Tinneberg H. R., Schill W. B. and Kruger T. F. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 2005 Mar; 83(3):635-42.
10. Aitken R.J. and Bakos H.W. Should we be measuring DNA damage in human spermatozoa? New light on an old question. *Hum Reprod* 2021 Apr 20; 36(5):1175-1185.
11. Casanovas A., Ribas-Maynou J., Lara-Cerrillo S., Jiménez-Macedo A.R., Hortal O., Benet J., Carrera J. and García-Peiró A. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertil Steril* 2019; 111:699-707. e1.
12. Aitken R. J., De Iuliis G.N. and McLachlan R.I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl.* 2009 Feb; 32(1):46-56.
13. Sakkas D., Manicardi G.C., Tomlinson M., Mandrioli M., Bizzaro D., Bianchi P.G. and Bianchi U. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod.* 2000 May; 15(5):1112-6.
14. Zini A., San Gabriel M. and Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet* (2009) 26:427–432.

15. Gosálvez J., González-Martínez M., López-Fernández C., Fernández J.L. and Sánchez-Martín P. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril* 2011 Nov; 96(5):1083-6.
16. Comar V.A., Petersen C.L., Mauri A.L., Mattila M, Vagnini L.D, Renzi A., ... Influence of the abstinence period on human sperm quality: analysis of 2,458 semen samples. *JBRA Assist Reprod.* 2017 Oct-Dec; 21(4):306–312.
17. Gil M., Sar-Shalom V., Meléndez Sivira Y., Carreras R. and Checa M. A. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30:479-85.
18. Tvrdá E., Lovíšek D., Kyzek S., Kováčik D., and Gálová E. The Effect of Non-Thermal Plasma on the Structural and Functional Characteristics of Human Spermatozoa. *Int J Mol Sci.* 2021 May; 22(9):4979.
19. Swain, J. E., Lai D., Takayama S. and Smith G. D. Thinking big by thinking small: application of microfluidic technology to improve ART. *Lab Chip* 2013 Apr 7; 13(7):1213-24.
20. Gianaroli L., Magli M. C., Collodel G., Moretti E., Ferraretti A. and Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril* 2008 Jul; 90(1):104-12.