

TESINA DE GRADO DE LA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA HUMANA

**“ESTUDIO DEL DAÑO DEL ADN
ESPERMÁTICO EN PACIENTES
INFÉRTILES”**

Gianni Curti

Diciembre de 2010

Estudio del Daño del ADN Espermático en Pacientes Infértiles

RESUMEN

Se diagnostica infertilidad conyugal a una pareja que lleva buscando sin éxito el embarazo por un período de al menos doce meses. Se ha estimado que este tipo de trastornos afecta aproximadamente al 15% de las parejas en edad reproductiva, y que en alrededor del 50% de los casos de infertilidad conyugal subyace un factor masculino. El daño en el ADN espermático se relaciona con la fertilidad del varón, asociándose con tasas de fecundación disminuidas *in vivo* e *in vitro*, con deficiencias en el desarrollo del embrión pre-implantatorio y con tasas de aborto aumentadas. Existen varias técnicas de selección de espermatozoides y varios métodos para evaluar la fragmentación del ADN espermático en una muestra seminal. Sin embargo, no todos se aplican cotidianamente en la clínica ya sea por su elevado costo, por la falta de estudios que avalen su utilidad y su inocuidad, o porque no existe un consenso para la interpretación del resultado que cada técnica arroja y su relación con la infertilidad. Intentando contribuir con la solución de estas carencias, el objetivo de este estudio fue analizar el uso de diversas técnicas de detección de daño del ADN espermático en una población de hombres infértiles correlacionándolas con los parámetros del espermograma clásico. Además nos propusimos comprobar si la combinación de las técnicas de selección de espermatozoides *swim-up* y MACS-Anexina-V (del inglés: *Magnetic Activated Cell Sorting*), puede mejorar la calidad de una muestra espermática. Se analizaron dos pruebas de detección de daño del ADN espermático: el test de naranja de acridina (NA), que detecta roturas en las moléculas de ADN y el test de dispersión de la cromatina (SCD, del inglés: *Sperm Chromatin Dispersion*), que se basa en la decondensación diferencial de la cromatina nativa y fragmentada para evidenciar daño en el ADN. Se encontró que el test SCD concuerda mejor que el test NA con los parámetros del espermograma clásico relacionados con la capacidad fecundante del espermatozoide (morfología y motilidad espermática). En adición a estos test, también se evaluaron dos protocolos de selección espermática, uno simple y comúnmente usado (*swim-up* convencional) y otro más complejo y en etapa de experimentación (MACS-Anexina-V). Se halló que el *swim-up* convencional disminuye significativamente el porcentaje de espermatozoides con daño en su ADN de $27,79 \pm 12,95\%$ a $11,00 \pm 7,53\%$ ($P < 0,0001$). Consistentemente, tras la separación por *swim-up*, muestras con índices de fragmentación basales más elevados presentan una disminución del porcentaje de espermatozoides con ADN dañado más notable que aquellas con índices de fragmentación basales más pequeños, ya que los resultados del test SCD basal se correlacionan directamente con la variación del porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado ($r = 0,815$; $P < 0,0001$; siendo r el coeficiente de correlación de Pearson). El daño en el ADN de los espermatozoides tiende a aumentar conforme avanza la edad del paciente luego del procesamiento del semen por *swim-up* ($r = 0,361$; $P < 0,05$). De acuerdo a nuestros resultados, la aplicación de MACS-Anexina-V en combinación con la técnica de *swim-up* mejora la obtención de espermatozoides móviles progresivos (de $74,75 \pm 7,54\%$ a $85,50 \pm 7,33\%$), y morfológicamente normales (de $4,50 \pm 2,52\%$ a $7,00 \pm 1,41\%$). Dicha combinación de técnicas mejoró también las características ultraestructurales de los espermatozoides evaluadas por microscopía electrónica de transmisión (MET) (de $11 \pm 2,65\%$ a $22,67 \pm 0,58\%$ de cabezas

normales), y disminuyó los índices de fragmentación del ADN espermático (de $21,50 \pm 6,61\%$ a $2,50 \pm 2,65\%$ de espermatozoides con daño en su ADN). Sin embargo los resultados obtenidos indican que la mejora significativa de la mayor parte de los parámetros evaluados está dada por el *swim-up* y no por la separación magnética. Esto indica que el *swim-up* convencional parece ser una excelente técnica de selección *per se*, no siendo necesarias metodologías adicionales sofisticadas y/o costosas como la separación magnética, para mejorar la calidad de una muestra espermática.

INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que aproximadamente un 15% de las parejas que intenta concebir por un periodo de doce meses o más no alcanza su objetivo (Dey, 2010), lo que se denomina infertilidad conyugal. Si bien generalmente no atenta contra la vida de los individuos de la pareja, la infertilidad conyugal produce importantes daños psicológicos a sus integrantes, muchas veces llevándolos a tratamientos largos y costosos, no siempre obteniendo resultados acordes. Al evaluar los posibles orígenes de la infertilidad de la pareja, aproximadamente un 30% de las causas responden al factor masculino por sí solo, con un 20% adicional que corresponde a factores masculinos en combinación con causas de origen femenino. Teniendo en cuenta estos datos, la incidencia del factor masculino en la infertilidad conyugal asciende a más de un 50 % (Ferlin *et al.*, 2007).

El análisis del semen es la prueba más importante en el inicio del diagnóstico de infertilidad masculina y debe ser necesariamente realizado por técnicos entrenados para asegurar la confiabilidad de los resultados (Menkveld, 2007; WHO, 2000). Un espermograma básico completo debe incluir un análisis físico o macroscópico en donde se evalúe el volumen de la muestra, su pH, su olor y color, su viscosidad y su licuefacción; y un estudio microscópico que tenga en cuenta el recuento y la concentración de espermatozoides, su motilidad, su morfología y su vitalidad, además de la presencia de otras células en el eyaculado discriminando entre leucocitos, células de la progenie espermática y células epiteliales. Para la correcta interpretación del resultado, el espermograma debe contener la información referente a la obtención de la muestra y al tiempo de abstinencia sexual previo a la obtención. (revisado en Menkveld, 2007; WHO, 1999; WHO, 2010).

Sea con fines diagnósticos, para la realización de diferentes ensayos, o como requisito previo para la realización de cualquier técnica de reproducción asistida, la muestra de semen debe ser procesada. La preparación del semen tiene como finalidad:

- separar a los espermatozoides del plasma seminal;
- aislar los espermatozoides móviles de los inmóviles, de los espermatozoides muertos, y de las demás células presentes en el eyaculado;
- aportar un medio de cultivo cuya composición apoye la homeostasis del espermatozoide (revisado en Sánchez *et al.*, 2009; WHO, 2010).

Existen varios métodos de preparación del semen con distintos niveles de complejidad. El procesamiento de una muestra por dilución y lavado es la estrategia más simple y se recomienda su aplicación en la preparación de muestras normozoospermicas¹ para inseminación artificial intra-uterina (IAIU) (WHO, 2010). Masivamente utilizada en los laboratorios de reproducción

¹ Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se dice que una muestra es *normozoospermica* cuando la concentración (o el número total) de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, igualan o superan los límites inferiores de los rangos de referencia (WHO, 2010).

asistida es la técnica de separación de espermatozoides mediante gradiente de densidad, que consiste en la colocación de una alícuota de semen sobre una columna líquida compuesta por la superposición de capas de soluciones con densidades crecientes. La centrifugación de estas preparaciones hace que las células migren hasta su punto isopícnico (del griego *picnos* = denso) (Arangino y Del Giacco, 1995). Los espermatozoides maduros por ser células compactas alcanzan la capa de mayor densidad y sedimentan en el fondo del tubo de donde pueden ser fácilmente recogidos (Sánchez *et al.*, 2009). También muy utilizadas son las técnicas de migración o *swim-up* que se basan en el movimiento propio de los espermatozoides desde el semen al medio de cultivo. El *swim-up* directo se realiza colocando una capa de medio de cultivo sobre una alícuota de semen. Dicha capa es recogida luego de incubar la preparación para permitir la migración hacia ella de los espermatozoides (Sánchez *et al.*, 2009; WHO, 2010). La técnica *swim-up* convencional difiere de la anterior en que el semen es lavado una o dos veces por dilución y centrifugación antes de colocar la capa de medio de cultivo, que en este caso se deposita sobre el *pellet* celular (Sánchez *et al.*, 2009). La última edición del manual de la OMS recomienda el uso del *swim-up* directo en muestras cuya motilidad espermática esté disminuida y los parámetros recuento y concentración no se alejen de los rangos de normalidad. Esto se debe a que la cantidad de espermatozoides recuperada por *swim-up* es baja en comparación con el rendimiento de otras técnicas. Los gradientes de densidad están recomendados para muestras con bajo recuento, bajo porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, o motilidad espermática comprometida (WHO, 2010). Pese a que en dicho manual no se aconseja realizar lavados previos al *swim-up*, la realización de estos lavados garantiza la separación del plasma seminal con todos sus posibles componentes infecciosos, por lo que el *swim-up* convencional sigue siendo la técnica de elección de muchos laboratorios (Bjorndahl *et al.*, 2005).

El factor masculino se relaciona directamente con la capacidad fecundante del espermatozoide y para evaluarla los parámetros del espermograma básico no son suficientes. A partir de un espermograma alterado es posible diagnosticar “infertilidad masculina”, pero salvo particulares excepciones, las anomalías detectadas en el espermograma no refieren a la etiología o al origen fisiopatológico de la infertilidad (Oehninger *et al.*, 2000). El desconocimiento de esto último lleva a dificultades en el manejo clínico del paciente que pueden resultar en “sobre-tratamiento” o “sub-tratamiento”, pudiendo una pareja padecer infertilidad aun cuando el espermograma no presente alteraciones. Es así que en la mayoría de los casos se hace necesaria una segunda instancia de pesquisa en el esquema de diagnóstico que vaya más allá de los parámetros “básicos” del espermograma. Si bien es cierto que el parámetro que mejor se ha correlacionado con la capacidad fecundante del espermatozoide, tanto *in vivo* como *in vitro*, es la morfología espermática siguiendo los criterios estrictos de análisis de espermatozoides (criterio estricto de Tygerberg)² (Kruger *et al.*, 1986; Donnelly *et al.*, 1998; Coetzee y Kruger, 2007; Kruger y Franken, 2004; Ombelet *et al.*, 1997), se han desarrollado otros ensayos que apuntan a la evaluación de la funcionalidad del gameto masculino y sus resultados también se han correlacionado en mayor o menor medida con la fertilidad del varón (Oehninger *et al.*, 2007). La mayor parte de ellos no se han incluido aún en el estudio seminal de rutina y son considerados por la OMS como procedimientos opcionales o de experimentación (WHO, 2010).

Existen varios test para el estudio de la interacción entre los espermatozoides y el mucus cervical, como el clásico *test post-coital* desarrollado para determinar el número de espermatozoides activos en la muestra de mucus, así como su comportamiento y sobrevivencia a distintos tiempos post-coito (WHO, 2010). Todos presentan el inconveniente de la introducción

² En lo que sigue de éste trabajo cuando se hable de morfología espermática, y salvo que se especifique que se trata de la morfología ultraestructural, se estará haciendo referencia a este criterio de clasificación morfológica.

del mucus, de composición y características extremadamente variables, por lo que el valor pronóstico de estos ensayos es discutido (van der Steeg *et al.*, 2004). Analizando la interacción espermatozoide-ovocito el *test de hemizona* consiste en la incubación de una cantidad estandarizada de espermatozoides junto con la mitad de una zona pelúcida microdisecionada, seguida de un recuento de los espermatozoides adheridos a la cara externa de la hemizona (WHO, 2010; Oehninger *et al.*, 2007). Este test presenta alta especificidad y sensibilidad, así como un alto valor predictivo para resultados de fertilización *in vitro* (Oehninger *et al.*, 2000), pese a ello está limitado al acceso no siempre sencillo a zonas pelúcidas y al equipamiento para seccionarlas. Otra prueba funcional que presenta buen valor pronóstico para resultados de fertilización *in vitro* es la evaluación de la reacción acrosómica inducida con ionóforos de calcio, fluido folicular, pentoxifilina, o por disminución de la temperatura; pero los valores de corte no son del todo claros y cambian según el método de inducción y la estrategia de visualización que se utilice. Además la especificidad de este tipo de pruebas es generalmente baja (Oehninger *et al.*, 2000). El *ensayo de penetración espermática* o *test de hámster* se utiliza para estudiar la penetración de los espermatozoides del paciente en ovocitos de hámster desprovistos de su zona pelúcida. Si bien no hay un valor de corte consenso y la tasa de resultados falsos positivos que arroja es muy alta (Oehninger *et al.*, 2000), este test provee información sobre la naturaleza fisiogénica de las membranas de la cabeza de los espermatozoides capacitados (WHO, 2010). El avance en la tecnología de los sistemas computarizados de análisis de espermatozoides (CASA, del inglés: *computer-aided sperm analysis*) permite cada vez con mayor confiabilidad, recabar datos acerca de las características cinemáticas de los espermatozoides (WHO, 2010). Pese a que por tratarse de un sistema automatizado elimina el error introducido por la subjetividad del ojo humano, los controles de calidad, la calibración del equipo, y el constante monitoreo del mismo, son requisitos necesarios para la confiabilidad de la información que el sistema brinda. Además el costo del equipamiento limita la accesibilidad de la técnica, siendo aún discutible la relación costo-beneficio teniendo en cuenta el valor pronóstico de sus resultados para con los resultados obtenidos con las técnicas de reproducción asistida (TRA) (Oehninger *et al.*, 2007). Recientemente se ha visto que el daño en el ADN de los espermatozoides está directamente correlacionado con la capacidad fecundante de dichas células tanto *in vivo* como *in vitro* (Spano *et al.*, 2000; Evenson *et al.*, 2002). Asimismo, el índice de fragmentación del ADN espermático se mantendría más constante a lo largo del tiempo respecto a otros parámetros seminales comúnmente evaluados (Zini *et al.*, 2001). Además, la integridad del ADN espermático se asocia con un posterior desarrollo embrionario normal (Aitken, 2006).

En el proceso de fecundación el espermatozoide provee al ovocito de un juego cromosómico haploide para así restaurar la condición diploide necesaria para el normal inicio del desarrollo del cigoto. Es crucial entonces que el material genético se transfiera íntegro e intacto desde el espermatozoide al ovocito. Sin embargo, en el análisis de cualquier muestra de semen y especialmente en el semen humano, se encontrará con mayor o menor frecuencia, espermatozoides que presentan su ADN fragmentado (Gosálvez *et al.*, 2006).

El daño en el ADN de las células germinales masculinas se asocia con tasas de fertilización disminuidas tanto en condiciones normales como cuando se aplican TRA como IAIU o fertilización *in vitro* (FIV). Se ha comprobado que el porcentaje de espermatozoides con daño en su ADN se relaciona con la aparición de deficiencias durante el desarrollo del embrión pre-implantatorio y con un aumento de las tasas de aborto (Sakkas *et al.*, 1998; Aitken y Krausz, 2001; Duran *et al.*, 2002; Benchaib *et al.*, 2003; Bungum *et al.*, 2004; Zini y Libman, 2006). La descendencia de pacientes con elevados niveles de daño en el ADN de sus espermatozoides, presenta una mayor incidencia de enfermedades genéticas dominantes, infertilidad y cáncer

cuando se compara con la descendencia de individuos con niveles normales de daño en el ADN espermático (Aitken y Krausz, 2001; Aitken *et al.*, 2004).

Se ha intentado establecer el o los orígenes del daño en el ADN del espermatozoide. De las múltiples teorías generadas, tres parecen ser las más convincentes: (1) estrés oxidativo generado por un desbalance entre la producción de especies oxígeno-reactivas por parte de espermatozoides y leucocitos y la actividad antioxidante del plasma seminal, (2) alteraciones en el empaquetamiento de la cromatina dadas por una actividad alterada de la enzima topoisomerasa II durante el reemplazo de histonas por protaminas en el proceso de maduración espermática, y (3) "apoptosis abortiva", esto es, eventos apoptóticos que normalmente ocurren durante la espermatogénesis, se descontrolan por razones que aún se desconocen, arrojando en el eyaculado espermatozoides que han entrado en la vía apoptótica (Tarozzi *et al.*, 2007). Por otro lado la exposición a contaminantes xenobióticos ingeridos durante la alimentación, la ingesta de ciertos fármacos, las infecciones en el tracto genital asociadas con leucocitospermia, los episodios de fiebres altas, una temperatura testicular elevada, o una edad avanzada, pueden ser factores que contribuyan al daño observado en el ADN espermático (Aitken y De Iuliis, 2007; Gosálvez *et al.*, 2006).

Diversos métodos se han desarrollado con el objetivo de detectar daño en el ADN de los espermatozoides, intentando correlacionar los resultados de los distintos test con la infertilidad masculina, existiendo ventajas y desventajas en cada uno (Evenson *et al.*, 2002). En nuestro país alguno de ellos ha sido incluido en los protocolos de diagnóstico, pero no existen estudios de los beneficios que esto pueda implicar en nuestra población.

Para estudiar la fragmentación del ADN espermático se pueden utilizar básicamente dos estrategias:

1. Estudiar la capacidad diferencial que presenta la cromatina y en particular el ADN, para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. Dentro de esta táctica se pueden utilizar técnicas tales como el *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA; Evenson *et al.*, 1999), el *DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization* (DBD-FISH; Fernández *et al.*, 2000), el ensayo cometa bajo condiciones desnaturalizantes (Singh *et al.*, 1988) y el test *Sperm Chromatin Dispersion* (Fernández *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2005).
2. Marcar las roturas en la hebra de ADN incorporando moléculas trazadoras en ciertos extremos de la rotura. Para ello es posible servirse de técnicas con procesos enzimáticos para la incorporación *in situ* de nucleótidos marcados, tales como la *Terminal dUTP Nick-End Labeling* (TUNEL; Lopes *et al.*, 1998) o la *In Situ Nick Translation* (ISNT; Gorczyca *et al.*, 1993); o incorporar agentes como el naranja de acridina que permiten diferenciar cuando se intercalan en una molécula de ADN intacta o cuando lo hacen en una dañada (test de Naranja de Acridina, NA; Hurst y Roy, 1985).

Entre los test más utilizados para la evaluación del nivel de fragmentación del ADN espermático en el semen humano, el **SCD** se destaca por su fácil y rápida aplicación, la estabilidad en la lectura de los resultados y la posibilidad de detectar diferentes niveles de daño en el ADN del espermatozoide (Gosálvez *et al.*, 2006). El test se basa en la inducción de una decondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto. El ADN del espermatozoide se encuentra unas seis veces más compactado que el del cromosoma mitótico y organizado en bucles de menor

tamaño que los de las células somáticas, anclados a la matriz nuclear. Dichos bucles se compactan por la acción de las protaminas que estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas. Si se rompen estos enlaces y se usa una solución específica de lisis para extraer proteínas, los bucles de ADN se relajan constituyendo halos alrededor de la estructura nuclear central residual y si se realiza un tratamiento desnaturalizante ácido, aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado no liberan bucles de ADN y no generan halo de dispersión de cromatina, o si lo hacen éste es de muy pequeño tamaño. Por el contrario los espermatozoides sin fragmentación en su ADN generan amplios halos de dispersión de los bucles de cromatina (Gosálvez *et al.*, 2006). La discriminación visual directa es muy clara y evidente. Con ello presente se realiza el recuento en la muestra y se calcula el índice de fragmentación del ADN, expresándose como el porcentaje de espermatozoides con ADN dañado en la muestra (Gosálvez *et al.*, 2006).

El **test de Naranja de Acridina** se basa en la naturaleza metacromática de este colorante que intercalándose en el ADN doble hebra (nativo) en forma de monómero, emite fluorescencia verde, mientras que cuando se asocia con hebras simples de ADN (desnaturalizado o extremos de roturas) forma un agregado que emite fluorescencia roja-anaranjada. El resultado del test se informa como el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia verde sobre el total de espermatozoides evaluados (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007; Shamsi *et al.*, 2008; Eggert-Kruse *et al.*, 1996). Chohan y cols. (2008) realizaron un estudio comparativo de técnicas de detección de daño en el ADN espermático. En dicho trabajo hallaron que el test NA arrojaba índices de fragmentación del ADN espermático significativamente más altos que los demás ensayos testeados. Asimismo no encontraron correlación entre los resultados del test NA y los resultados de las demás pruebas (entre ellas el test SCD), tanto en pacientes infértiles como en los controles fértiles, y atribuyen esto a la escasa reproducibilidad del resultado del test NA.

La interpretación de los diversos test utilizados debería por un lado ser capaz de identificar pacientes con dificultad para concebir pero también establecer opciones terapéuticas. Dichas opciones para individuos con elevados índices de fragmentación del ADN espermático no son muchas, sus beneficios no son del todo claros o convincentes y dada su reciente aparición la mayoría se encuentra en etapa de experimentación (Aitken *et al.*, 2008).

Aitken y colaboradores clasifican las estrategias terapéuticas existentes en dos grandes grupos; un primer grupo engloba a todas las técnicas que tras una selección logran aislar sólo espermatozoides con bajos niveles de daño en su ADN, mientras que el segundo consiste en los tratamientos con antioxidantes (Aitken *et al.*, 2008).

La selección de espermatozoides sin daño en su ADN a partir de una muestra con elevado índice de fragmentación para su uso en TRA es indirecta. Esto es, son seleccionados en base a otro criterio (migración electroforética, un marcador de membrana, características morfológicas, etc.) y se infiere que el daño en su ADN y ese criterio están positivamente correlacionados.

En 2006 se reportó el uso de un procedimiento de separación celular mediante columnas magnéticas empleando como conjugado la molécula de Anexina-V, como posible método de separación de espermatozoides en la práctica clínica (*Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS-Anexina-V; Said *et al.*, 2006). La anexina-V es una proteína de unión a fosfolípidos que tiene alta afinidad por la fosfatidilserina. Esta última normalmente se encuentra en la cara interna de la bicapa fosfolipídica que constituye la membrana celular. La externalización de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la bicapa es uno de los primeros eventos que ocurren cuando una célula entra en proceso de muerte programada (apoptosis). En este fenómeno reportado en

espermatozoides humanos (Barroso *et al.*, 2000; Weng *et al.*, 2002) se basó la idea de conjugar esferas submicroscópicas superparamagnéticas con anexina-V e incubar muestras procesadas de semen humano con ellas, para luego hacer pasar esta suspensión por una columna sometida a un fuerte campo magnético, de manera que aquellos espermatozoides que hayan adherido microesferas a su membrana queden retenidos en la columna, separándolos así de los espermatozoides no apoptóticos que fluyen a través de la columna (Said *et al.*, 2005). Se vio que la suspensión con los espermatozoides que fluían libremente a través de la columna presentaba índices de fragmentación del ADN espermático significativamente menores que los niveles hallados en la muestra antes de la separación (Said *et al.*, 2006). Se demostró además que la aplicación de esta estrategia de selección aumenta la proporción de espermatozoides capaces de fecundar (Said *et al.*, 2008b). Pese a que la técnica continúa en fase de experimentación se ha publicado recientemente su utilización como complemento en TRA para el tratamiento de pacientes con elevados índices de fragmentación del ADN espermático (Dirican *et al.*, 2008). El nacimiento del primer niño sano concebido mediante MACS-Anexina-V se publicó a principios de 2010 (Rawe *et al.*, 2010).

Recapitulando, el factor masculino está presente en alrededor del 50% de los casos de infertilidad conyugal, y los parámetros evaluados en el espermograma clásico no siempre son suficientes para lograr un diagnóstico preciso. Además el daño en el ADN espermático, impacta negativamente en los resultados de TRA relacionándose con infertilidad y pudiendo explicar muchos casos de infertilidad idiopática. Existen varios métodos de detección de fragmentación del ADN espermático. También son varias las opciones terapéuticas disponibles para pacientes con elevados índices de fragmentación y aún no hay consenso sobre un algoritmo de diagnóstico y tratamiento para estos pacientes. Teniendo en cuenta todo lo anterior y que en nuestra población no existen estudios dentro de ésta línea, es que se plantean los objetivos que a continuación se detallan.

OBJETIVO GENERAL

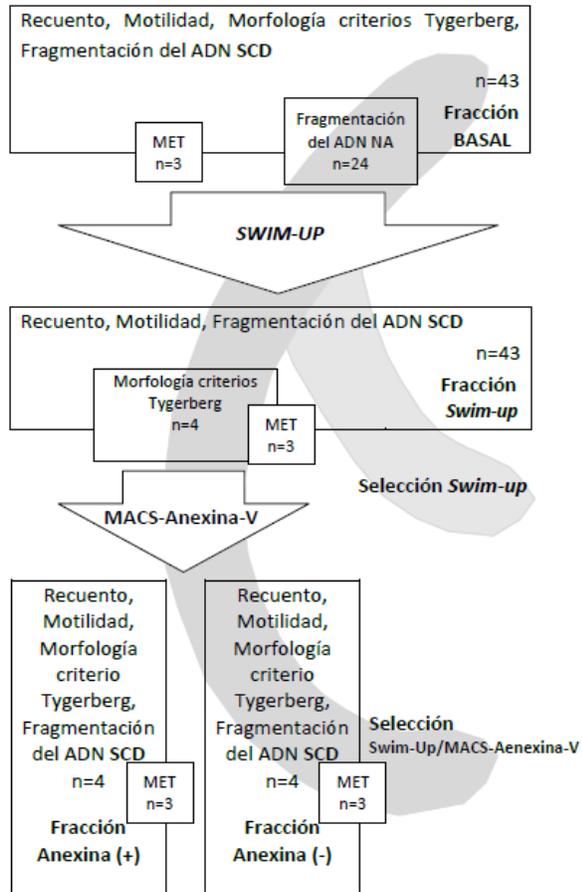
Analizar el uso de diversas técnicas de detección de daño del ADN espermático en una población de hombres infértiles correlacionándolas con los parámetros del espermograma clásico, además de comprobar si la combinación de las técnicas de selección de espermatozoides *swim-up* y MACS-Anexina-V puede mejorar la calidad de la muestra espermática.

La hipótesis testada fue que el daño del ADN espermático se correlaciona con los parámetros espermáticos indicadores de infertilidad masculina y que la técnica *swim-up*/MACS-Anexina-V es capaz de mejorar la calidad del semen mediante la eliminación de espermatozoides dañados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analizar y comparar dos métodos de detección de daño en el ADN espermático (SCD y NA), en pacientes infértiles.
- 2) Correlacionar los datos obtenidos respecto al daño del ADN espermático, con los parámetros evaluados en el espermograma convencional, antes y después de un método rutinario de selección (*swim-up*).
- 3) Determinar la eficiencia de la selección de espermatozoides por *swim-up*/MACS-Anexina-V cotejándola con la eficiencia de la selección por *swim-up* únicamente.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Para cumplir el objetivo 1 se analizaron muestras obtenidas de 50 pacientes infértiles por dos métodos de detección de daño espermático y se observó la correlación entre ambos con la morfología y la motilidad.

Para cumplir el objetivo 2 se correlacionaron estadísticamente la edad del paciente, la morfología y la motilidad espermática con el índice de fragmentación del ADN evaluado por SCD en la muestra fresca y en la fracción seleccionada por *swim-up*.

Para cumplir el objetivo 3 se analizaron las diferentes fracciones obtenidas luego de la separación con *swim-up*/MACS-Anexina-V de 3 o 4 muestras de pacientes seleccionados de acuerdo al resultado de espermogramas previos. Se compararon la muestra de partida, la fracción celular seleccionada y la fracción celular de descarte, mediante el análisis de la morfología por microscopía de campo claro y por microscopía electrónica de transmisión, el estudio de la motilidad espermática, y la evaluación del daño en el ADN de los espermatozoides testeado por SCD. (Figura 1)

Fig. 1 – Esquema del diseño experimental. Se detallan los pasos de las dos selecciones de espermatozoides realizadas, las fracciones obtenidas, los parámetros testeados en cada una de ellas y el n (número de muestras) estudiadas. SCD=*Sperm Chromatin Dispersion*; NA=Naranja de Acridina; MET=Microscopía Electrónica de Transmisión; MACS=*Magnetic-Activating Cell Sorting*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes.

Se trabajó con 50 pacientes con infertilidad conyugal, seleccionados del programa de fertilización *in vitro* (FIV) del Centro de Reproducción Humana del Interior (Cerhin). Todos fueron sometidos a un examen físico estándar para descartar volumen anormal de las glándulas reproductivas y/o presencia de varicocele. De ellos 7 fueron excluidos del estudio por presentar una concentración espermática basal insuficiente para realizar la técnica de *swim-up* y los demás ensayos ($<2 \times 10^6$ /mL). A las muestras de semen de los 43 pacientes restantes se les realizó el estudio de rutina basal y la separación por *swim-up*. La fragmentación del ADN de la fracción basal y de la obtenida por *swim-up* de todas las muestras se estudió por el test SCD. Además a 24 muestras elegidas al azar se les realizó el test de NA en la fracción basal. En la fracción seleccionada por *swim-up* de las 43 muestras se analizó la concentración y la motilidad espermática. Se escogieron 4 muestras con un recuento total superior a 200×10^6 espermatozoides

para testear el proceso de selección que combina *swim-up* y MACS-Anexina-V. En las fracciones obtenidas durante dicho proceso se analizó concentración, motilidad, morfología, fragmentación del ADN espermático (test SCD), y características ultraestructurales (MET). (Figura 1)

Obtención de las muestras y estudio basal.

Las muestras de semen se recolectaron por masturbación luego de una abstinencia sexual de 2 a 7 días en recipientes plásticos descartables estériles para análisis clínicos. Luego de la licuefacción se evaluó el pH y las características macroscópicas del semen (volumen, viscosidad, turbidez, color, presencia de coágulos gelatinosos). El análisis microscópico se realizó en cámara de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa – Israel) con magnificación 200X y en microscopio de campo claro (Olympus CH) evaluándose por duplicado y en al menos 200 espermatozoides la motilidad³, su concentración en millones por mililitro, el recuento total en millones de células, y la presencia en la muestra de otros tipos celulares (Fracción Basal).

Evaluación de la morfología espermática.

La morfología espermática se evaluó según el criterio estricto de Tygerberg en microscopio de campo claro (Olympus CH) empleando una lente objetiva 100X, bajo aceite de inmersión (magnificación final 1000X). Para ello se realizaron extendidos en portaobjetos que luego de fijarlos en metanol absoluto se tiñeron con hematoxilina de Harris. Para la evaluación de la morfología en la fracción basal, los extendidos se realizaron con 10 µL de la muestra fresca luego de su licuefacción. Para la evaluación de la morfología en la fracción “*swim-up*”, los extendidos se realizaron con 10 µL de la suspensión producto de la selección de espermatozoides por *swim-up* (ver más adelante). Se estudió un mínimo de 200 espermatozoides por preparado y se registró el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.

Selección de espermatozoides por Swim-Up.

La técnica de *swim-up* empleada se conoce como *swim-up* convencional (Sánchez *et al.*, 2009; Franco Jr. *et al.*, 2000; Ahumada *et al.*, 1998). Brevemente, tras su licuefacción las muestras se lavaron dos veces en medio *Hepes-Modified Human Tubal Fluid with Gentamicin* (Irvine Scientific, Santa Ana CA, USA) suplementado al 10% con *Serum Substitute Supplement*, (mHTF-SSS, Irvine Scientific) para descartar el plasma seminal. Sobre cada pellet obtenido se colocaron 500 µL de mHTF-SSS. Luego de incubar a 37°C durante 60 minutos se recolectaron los sobrenadantes ahora enriquecidos con espermatozoides móviles (Fracción *Swim-up*).

Selección de espermatozoides por MACS-Anexina-V.

La selección de espermatozoides por MACS-Anexina-V se realizó según las especificaciones del fabricante con mínimas modificaciones. Para ello las fracciones “*swim-up*” se lavaron con *Binding Buffer* 1X (Miltenyi Biotec, Germany) (BB), y se incubaron en una suspensión de microesferas submicroscópicas superparamagnéticas conjugadas con anexina V (Miltenyi Biotec) durante 25 minutos a temperatura ambiente bajo agitación continua moderada. Luego la suspensión se pasó a través de una columna (*MS Columns*, Miltenyi Biotec) sometida a un fuerte campo magnético (0,5 T entre los polos del magneto, más de 1,5 T entre las esferas metálicas de la columna). La fracción que se recolectó tras el pasaje a través de la columna se corresponde

³ Se trabajó con los valores de “motilidad progresiva”, siendo éstos las categorías “A+B” según OMS, 1999

con la fracción de espermatozoides anexina (-) mientras que la que quedó capturada en la columna fue la fracción anexina (+). Ambas se lavaron en mHTF-SSS. Los parámetros cinemáticos se evaluaron inmediatamente después de la recolección y tras una incubación de 30 minutos a 37° informándose esta última medición. Las determinaciones de morfología, fragmentación del ADN y MET se realizaron luego de la incubación. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar horizontal.

Estudio de la fragmentación del ADN espermático.

Test de dispersión de la cromatina (*Sperm Chromatin Dispersion Test*)

El test se realizó según modificaciones introducidas por Fernández y colaboradores en 2005 (Fernández *et al.*, 2005), incluyendo las muestras en un microgel de agarosa de bajo punto de fusión (*Agarosa II Low Melting Point*, Amresco, USA) en un portaobjetos pretratado con una lámina de agarosa al 1% (*Agarosa A*, BioBasic, Canadá) y realizándoles un tratamiento de desnaturalización ácida (HCl) y uno de lisis (2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanediol (Tris) 0.001-2M (Amresco); Triton X100 0.1-3% (Amresco); NaCl 1-3M (Amresco); dithiothreitol (DTT) 0.001-2M (Amresco)) para su posterior tinción con solución de Wright y su observación en microscopio de campo claro (Olympus CH) bajo un aumento de 400X. Se evaluaron 200 espermatozoides por duplicado y se registró el promedio de los porcentajes de espermatozoides con ADN fragmentado.

Test de Naranja de Acridina (NA).

Este test se realizó en extendidos de espermatozoides sobre portaobjetos fijados *overnight* con metanol y ácido acético en proporciones 3:1 y teñidos con solución de Naranja de Acridina (0,19 mg/mL) al reparo de la luz. Las preparaciones se observaron en microscopio de epifluorescencia (Nikon) a 400 aumentos con una longitud de onda de excitación de 450-490 nm. Tras evaluar 200 espermatozoides por lámina se registró el porcentaje de espermatozoides con daño en su ADN.

Análisis de las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

Para el estudio de las características ultraestructurales de los espermatozoides por MET, una alícuota de 0,5-1,0 mL de cada fracción espermática se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos y fijados durante toda la noche en una solución de paraformaldehído (PAF) al 4% (v/v) en buffer fosfato (PB) con 2,5% (v/v) de glutaraldehído, pH 7.2-7.4. La post-fijación se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias (UDELAR) exponiendo los pellets a una solución de tetróxido de osmio al 1% (v/v) durante una hora. Luego de sucesivos lavados en PB, el material se deshidrató mediante pasajes por soluciones de etanol de concentración creciente seguidos de acetona ppa al 100% (v/v). Acto seguido las muestras fueron embebidas en araldita (Fluka) de concentración creciente, e incluidas en bloques de araldita pura que se polimerizaron en estufa a 60°C durante 48hs. Se realizaron cortes semi y ultrafinos (250-500nm y 50-70 nm respectivamente) de las preparaciones con un ultramicrotomo RMC MT-X (RMC Products, Arizona, USA) con una cuchilla de diamante *Diatome*. Los cortes fueron contrastados con una solución acuosa de acetato de uranilo a saturación, seguido de citrato de plomo (Reynolds) y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010 (Jeol, USA) a 80 kV. Las imágenes fueron capturadas mediante una cámara digital Hamamatsu C-4742-95 (Hamamatsu Photonics UK Limited, United Kingdom) y procesadas en el programa Photoimpact 4.2. Por cada fracción

se analizaron al menos 100 secciones de cabezas y 100 correspondientes a colas espermáticas. Las características ultraestructurales se clasificaron según Chemes y Rawe (2003) (ver figura 12) y se expresaron como media \pm desvío estándar (media \pm SD) del porcentaje del total de secciones observadas de cada preparación.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el software JMP 8.0 Statistical Discovery Software (SAS Institute Inc.) y el SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.). Para las diferencias entre medias se utilizó t-test y ANOVA, y en la búsqueda de asociaciones se utilizaron análisis bivariados o multivariados aplicando el test de correlación de Pearson. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

-1-

Análisis comparativo de dos métodos de detección de daño en el ADN espermático (SCD y NA) en pacientes infértiles.

Comparación de los resultados del test SCD y del test NA con su correlación con parámetros del espermograma convencional (morfología y motilidad).

Se comparó el resultado de los estudios de asociación de la morfología según criterios de Tygerberg y la motilidad progresiva, con la fragmentación del ADN espermático cuando ésta se mide por NA o SCD, en las 24 muestras evaluadas con ambas técnicas.

Se encontró que los resultados del test SCD se correlacionan significativamente de manera inversa con la motilidad progresiva ($r = -0,656$, $P < 0,0005$; Figura 2A, ver también figura 6), y que tienden a asociarse también inversamente con la morfología según Tygerberg. ($r = -0,266$, $P > 0,05$; Figura 2C, ver también figura 4). No se hallaron asociaciones significativas ni tendencias cuando se analizó la correlación de los mismos parámetros con los resultados del test de NA. (Figuras 2B y 2D)

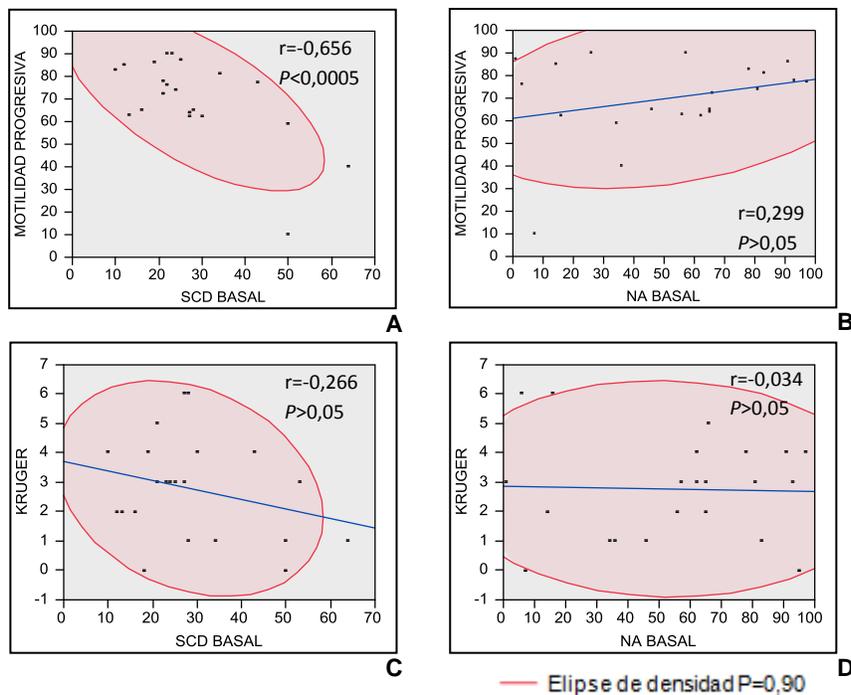


Fig. 2 – Comparación de los resultados de los test de evaluación de daño en el ADN con su correlación con motilidad y morfología. Diagramas de dispersión de los análisis de correlación de la fragmentación del ADN espermático evaluada por SCD con la motilidad progresiva (A) y la morfología según Tygerberg (KRUGER) (C); y de la fragmentación evaluada por NA con la motilidad progresiva (B) y la morfología según Tygerberg (KRUGER) (D). En los casos en que la correlación no es estadísticamente significativa se muestra la línea de tendencia en azul. $n=24$ (r , coeficiente de correlación de Pearson; NA, naranja de acridina)

Correlación entre los resultados del test SCD y del test de NA para la determinación de la fragmentación del ADN espermático.

Cuando se compararon las determinaciones de los índices de fragmentación del ADN por NA con los resultados del test SCD realizado sobre las mismas muestras frescas no se encontró correlación significativa alguna entre ambas pruebas ($r = -0,143$; $P > 0,05$). (Figura 3A)

Debido a que no se observó correlación entre SCD y NA y a que el primer test concuerda mejor con los parámetros del espermograma clásicamente relacionados con la capacidad fecundante del espermatozoide, en este trabajo la fragmentación del ADN espermático se continuó evaluando mediante el test SCD.

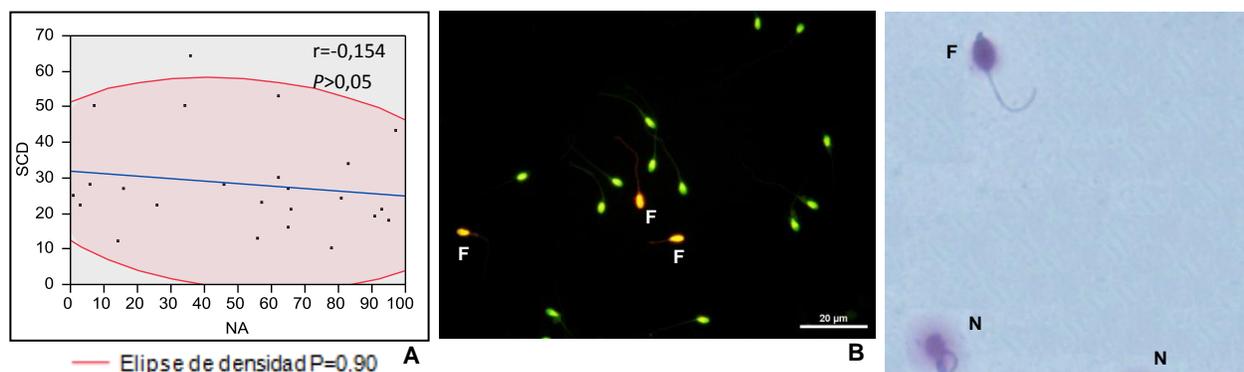


Fig. 3 – Pruebas de SCD y NA de detección de daño en el ADN espermático. A) Diagrama de dispersión del análisis de correlación entre las dos técnicas de detección de daño. $n=24$ (r , coeficiente de correlación de Pearson) B) Espermatozoides tratados con NA, verde, NA(-), ADN nativo, F naranja, NA(+), ADN fragmentado. C) Espermatozoides tratados con SCD, F sin halo de dispersión de la cromatina, ADN fragmentado; N halo de dispersión presente, ADN nativo.

-2-

Correlación entre daño del ADN espermático con los parámetros evaluados en el espermograma convencional, antes y después de un método rutinario de selección (*swim-up*).

Relación entre la fragmentación del ADN espermático y la edad del paciente.

El promedio de edad de los pacientes incluidos en el estudio fue igual a $36,45 \pm 5,79$ años, con un rango comprendido entre los 25 y los 50 años. Debido a que se ha reportado una relación entre daño espermático y edad de los pacientes infértiles (Vagnini *et al.*, 2007), se estudió la relación entre estas dos variables discriminando entre el nivel de fragmentación del ADN espermático de la fracción basal, la fracción post-*swim-up* y la variación entre ambos. (Figura 3) Se encontró una asociación significativa entre la edad y el índice de fragmentación de la fracción espermática seleccionada por *swim-up* ($P < 0,05$). Dicha asociación es directa ($r = 0,361$). (Figura 3B)

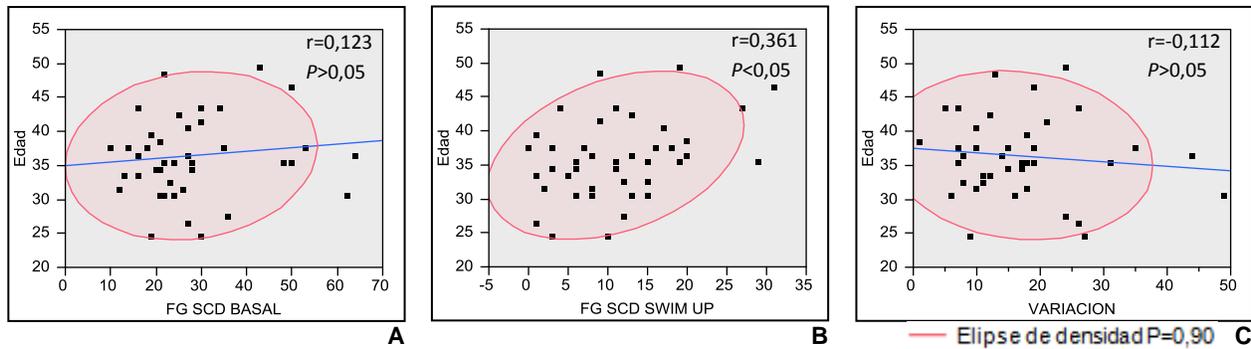


Fig. 3 – Relación entre la edad y la fragmentación del ADN espermático (SCD). Los diagramas de dispersión presentan los resultados del análisis bivariado de la edad vs. el índice de fragmentación del ADN espermático medido por test SCD de la fracción basal (A), el de la seleccionada por *swim-up* (B) y la diferencia entre ambos (C). En cada uno se muestra la correlación existente entre las variables evaluadas. En A y C puede verse la línea de tendencia. n=43 (r, coeficiente de correlación de Pearson)

Relación entre la morfología espermática según criterios estrictos y la fragmentación del ADN.

Del análisis bivariado de la morfología espermática según criterios de Tygerberg y el porcentaje de espermatozoides con ADN dañado se observó una tendencia de correlación (no significativa estadísticamente) entre la morfología y la fragmentación del ADN de la fracción basal, que se acentuó cuando la morfología basal se correlacionó con la fragmentación del ADN de la fracción seleccionada por *swim-up*. No se evidenció ninguna correlación cuando se estudió la morfología con la diferencia entre los índices de fragmentación del ADN de las fracciones mencionadas. (Figura 4)

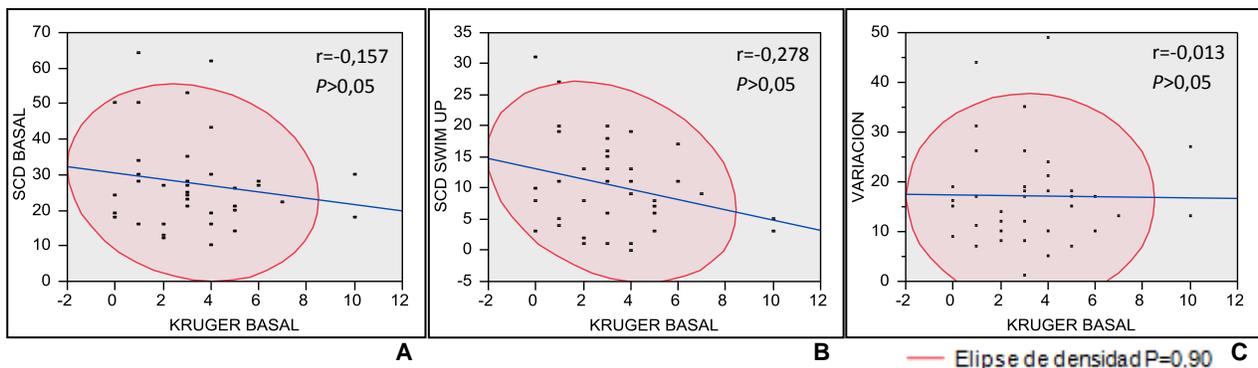


Fig. 4 – Relación entre la morfología espermática y la fragmentación del ADN espermático (SCD). Los diagramas de dispersión presentan los resultados del análisis bivariado de la morfología según criterios de Tygerberg (KRUGER) vs. el índice de fragmentación del ADN espermático medido por test SCD de la fracción basal (A), el de la seleccionada por *swim-up* (B) y la diferencia entre ambos (C). En cada uno se muestra la correlación existente entre las variables evaluadas y las líneas de tendencia. n=43 (r, coeficiente de correlación de Pearson)

Relación entre la motilidad progresiva y la fragmentación del ADN espermático.

Para determinar la relación entre la motilidad progresiva y la fragmentación del ADN se tomaron todos los pares de datos de las fracciones basales y todos los pares de datos de las suspensiones obtenidas tras la separación por *swim-up*. De esta forma se alcanzó un número de 75 pares de valores. Nótese que este número es menor al doble del número de muestras que se manejaron ya que a algunas muestras no se les analizó la motilidad post-*swim-up*.

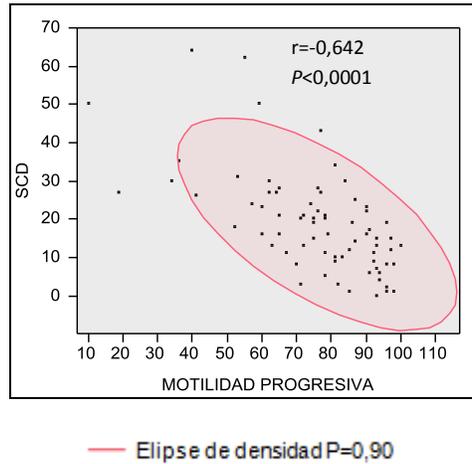


Fig. 5 – Relación entre la motilidad progresiva y la fragmentación del ADN espermático (SCD). Diagrama de dispersión que esquematiza el análisis de correlación entre la motilidad progresiva (categorías A+B según OMS, 1999) y el índice de fragmentación del ADN espermático medido por el test SCD. Los valores graficados en la figura corresponden a porcentajes. n=75 (r, coeficiente de correlación de Pearson)

Se encontró que la motilidad progresiva y la fragmentación del ADN de los espermatozoides se relacionan de manera inversa ($r = -0,642$), y que esta relación es estadísticamente significativa ($P < 0,0001$). (Figura 5)

Efecto de la selección de espermatozoides por Swim-Up sobre el índice de fragmentación del ADN.

El índice de fragmentación del ADN espermático evaluado mediante el test SCD de la fracción de espermatozoides seleccionada por *swim-up* fue significativamente menor que el índice de fragmentación hallado en la fracción basal ($P < 0,001$). La variación media entre los índices mencionados fue de aproximadamente 17 puntos porcentuales. (Tabla 1; Figura 6A)

Tabla 1 - Fragmentación del ADN espermático (SCD) de la fracción basal y la seleccionada por *swim-up*. Los valores representan el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado sobre el total evaluado. La última columna corresponde a la diferencia entre las dos primeras. Los datos se presentan como media±desvío estándar. * indica diferencia significativa entre los dos valores ($P < 0,001$) n=43

BASAL	SWIM-UP	VARIACIÓN
27,79±12,95*	11,00±7,53*	16,79±9,79

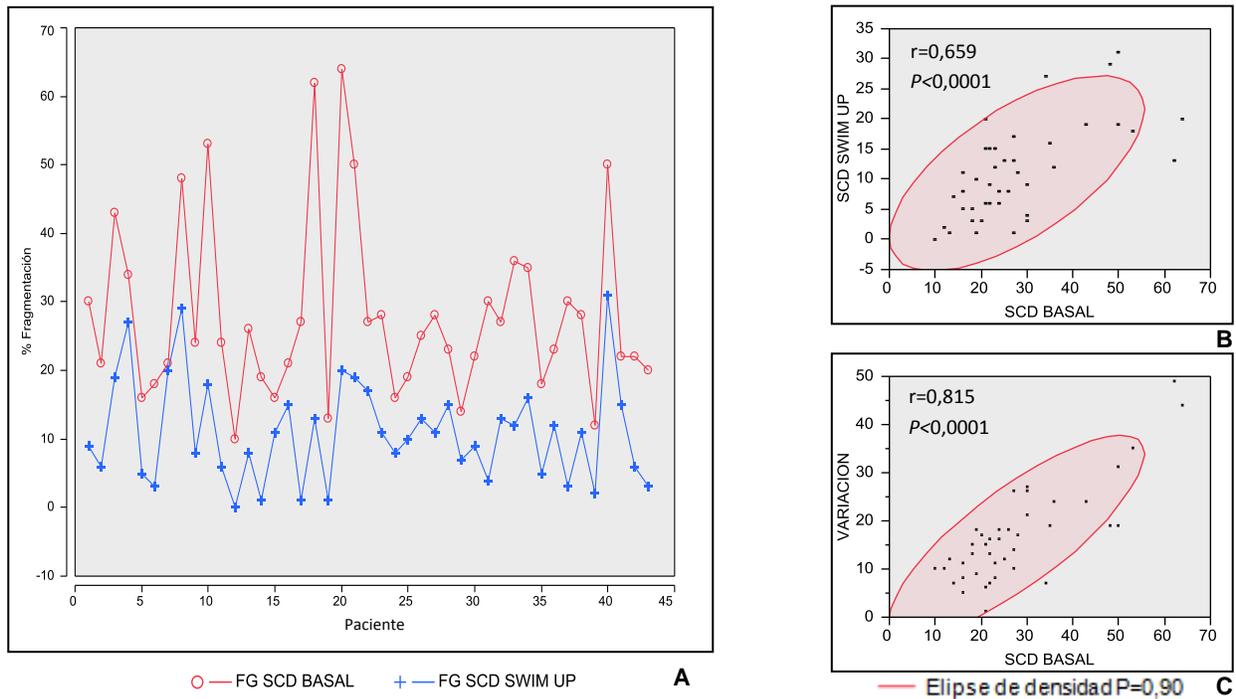


Fig. 6 – Fragmentación del ADN espermático evaluado por test SCD de las fracciones basal y post-swim-up. A) En el gráfico se muestran apareados los valores del porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado de ambas fracciones. B) Diagrama de dispersión que esquematiza el resultado del análisis de asociación de ambas variables. C) Diagrama de dispersión que esquematiza el resultado del análisis de asociación de los índices de fragmentación del ADN espermático basal y la variación del índice de fragmentación basal y post-swim-up. n=43 (r, coeficiente de correlación de Pearson)

El estudio de la asociación entre estas variables mostró una correlación positiva entre los índices de fragmentación del ADN espermático basal y post-swim-up ($r=0,659$), siendo ésta correlación estadísticamente significativa ($P<0,0001$) (Figura 6B). El índice de fragmentación del ADN evaluado en la fracción basal se correlacionó positivamente con la variación observada entre los índices de fragmentación del ADN espermático basal y post-swim-up ($r=0,815$), siendo dicha correlación significativa ($P<0,0001$) (Figura 6C).

-3-

Determinación de la eficiencia de la selección de espermatozoides por swim-up/MACS-Anexina-V cotejándola con la eficiencia de la selección por swim-up únicamente.

Efecto de la selección de espermatozoides por swim-up/MACS-Anexina-V en la fragmentación del ADN espermático, en la cinemática y en la morfología según criterios estrictos.

Los resultados de los parámetros cinemáticos, la morfología según criterio de Tygerberg, y la fragmentación del ADN espermático evaluada por el test SCD, analizados durante el proceso de separación por swim-up/ MACS-Anexina-V se presentan en la tabla 2. Los dos últimos parámetros estudiados en cada fase del proceso de selección espermática se muestran graficados en la figura 7.

El examen cinemático mostró una mejora significativa ($P<0,001$) de la movilidad progresiva en la primera fase de la selección, esto es, debida a la separación de espermatozoides por la técnica de *swim-up*, prevista ya por los resultados antes expuestos. La comparación de este mismo parámetro antes y después del pasaje de los espermatozoides a través de la columna no reflejó significancia estadística. La movilidad de los espermatozoides que quedaron atrapados en la columna durante la separación, luego de ser eluidos resultó ser significativamente menor que la movilidad de las demás fracciones.

El índice de fragmentación del ADN espermático mostró también una mejora significativa ($P<0,05$) en la primera etapa de la selección, lo que concuerda con los resultados antes mencionados en el apartado “*Efecto de la selección de espermatozoides por Swim-Up sobre el índice de fragmentación del ADN*” de esta sección. El índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides seleccionados por MACS-Anexina-V fue significativamente menor ($P<0,05$) que el índice de fragmentación detectado en la muestra basal, pero no se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó con la muestra seleccionada por *swim-up*, que fue la suspensión de células que ingresó a la columna⁴. La diferencia entre el índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides retenidos en la columna durante la separación y el de aquellos que fluyeron a través de la misma fue significativa ($P<0,05$).

La morfología espermática evaluada según criterios estrictos de Tygerberg no mostró cambios significativos durante el proceso de selección. Solamente se encontró una diferencia estadísticamente relevante entre las fracciones espermáticas separadas por las columnas, las fracciones ANEXINA (-) y ANEXINA (+) ($P<0,05$).

Tabla 2 – Efecto de la selección de espermatozoides por *swim-up*/MACS-Anexina-V. Cada columna representa una de las instancias de la separación: la muestra de partida (BASAL), la primera selección (*SWIM-UP*) y los productos finales de la separación (ANEXINA (-) y ANEXINA (+)). La morfología espermática se evaluó según criterios estrictos de Tygerberg, la fragmentación del ADN espermático por el test SCD y la movilidad progresiva según lineamientos de la OMS (1999). Todos los valores representan medias±SD. Aquellos que llevan un mismo subíndice difieren significativamente entre sí (con $P<0,001$ para motilidad, $P<0,05$ para fragmentación del ADN y morfología). n=4

	BASAL	SWIM-UP	ANEXINA (-)	ANEXINA (+)
MOVILIDAD PROGRESIVA % espermatozoides móviles progresivos (A+B)	74,75±7,54 ^{c,d}	90,25±5,56 ^{a,d}	85,50±7,33 ^b	10,75±9,36 ^{a,b,c}
FRAGMENTACIÓN DEL ADN % espermatozoides con ADN dañado	21,50±6,61 ^{1,2}	5,75±2,75 ¹	2,50±2,65 ^{2,3}	51,50±30,12 ³
MORFOLOGÍA % espermatozoides normales	4,50±2,52	5,25±2,75	7,00±1,41 [*]	0,75±0,96 [*]

⁴ Ver “*Separación de espermatozoides por MACS-Anexina-V*” en la sección “*Materiales y Métodos*”

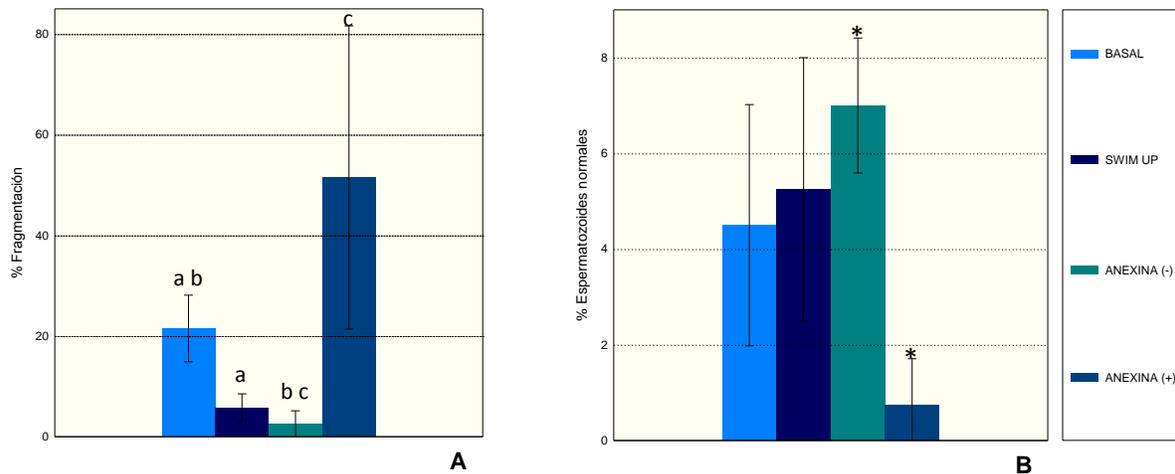


Fig. 7 – Efecto de la selección de espermatozoides por swim-up/MACS-Anexina-V en la morfología y la fragmentación del ADN espermático. A) Índices de fragmentación del ADN espermático evaluados por test SCD de las distintas fracciones del proceso de selección de espermatozoides por swim-up/ MACS-Anexina-V. El gráfico presenta la media con los desvíos estándar de los porcentajes de espermatozoides con daño en su ADN de todas las fracciones. Las barras con un mismo subíndice difieren significativamente entre sí ($P < 0,05$). B) Morfología espermática según criterios estrictos de Tygerberg de las fracciones del proceso de selección. El gráfico presenta la media con los desvíos estándar de los porcentajes de espermatozoides normales de todas las fracciones. * indica diferencia significativa entre las barras ($P < 0,001$). n=4

Efecto de la selección espermática por swim-up/MACS-Anexina-V en las características ultraestructurales de los espermatozoides.

Las características ultraestructurales de los espermatozoides a lo largo del proceso de selección fueron estudiadas por MET como se detalló en la sección “MATERIALES Y MÉTODOS”. En primera instancia se catalogaron las cabezas y colas como normales o anormales y se expresaron como porcentaje del total. Se consideró normal una cabeza espermática cuando su cromatina se presentaba compacta y uniforme, sin rarefacciones intranucleares que ocupasen más del 20% del núcleo, con membranas continuas y de aspecto uniforme, con un acrosoma de espesor constante, contenido uniforme, adherido al núcleo y recubriéndolo en un 40% - 70%, sin restos citoplasmáticos o membranosos y con forma global típica (Figura 12.1). Un corte de cola normal se contabilizó cuando presentaba el arreglo microtubular típico (9 pares periféricos más un par central) en el centro del flagelo, rodeado por membranas uniformes (Figura 12.2) y, dependiendo de la sección, una vaina de mitocondrias también uniforme (Figura 12.13). Toda cabeza o cola con alguna desviación en alguna de estas características fue considerada anormal.

Luego se discriminó en cuanto a las características ultraestructurales afectadas en las cabezas y colas. Se consideraron líticas aquellas cabezas con interrupciones en sus membranas, contenido nuclear diseminado y/o con signos de degradación (Figura 12.3); binucleadas cuando pudo observarse una clara división en el núcleo (Figura 12.4) y con restos de membrana o citoplasma cuando a pesar de observarse normales para los demás parámetros, presentaban restos membranosos o citoplasmáticos de un tamaño mayor al 20% del tamaño de la cabeza (Figura 12.5). La cromatina se clasificó como madura cuando se presentaba compacta y uniforme

(Figura 12.6); inmadura cuando se presentaba granular (Figura 12.7); o con presencia de rarefacciones intranucleares cuando éstas ocupaban más del 20% del núcleo (Figura 12.8). Los acrosomas se consideraron de forma alterada cuando su morfología se desviaba de la normal (Figura 12.9); desplazados o “festoneados” cuando no se encontraban adheridos al núcleo y se veían como en la figura 12.10; miniacrosomas cuando no alcanzaban a cubrir el 40% del núcleo (Figura 12.11); reaccionados cuando se observaban segmentados, en forma de “vacuolas” y/o con su contenido disperso (Figura 12.12). Dentro de las anomalías de cola se distinguió entre colas con elementos microtubulares supernumerarios cuando además de los pares canónicos presentaban uno o más pares de microtúbulos (indicado con flecha en la figura 12.13); con pares ausentes, en especial con ausencia del par central o configuración microtubular “9+0” (Figura 12.14); con desorganización total del axonema cuando los pares de microtúbulos se mostraban rompiendo la configuración canónica (Figura 12.15); con el axonema desplazado del centro del flagelo; y colas con hemiaxonema cuando se observaban como se indica en la figura 12.16.

En la tabla 3 se muestran los resultados de dicho estudio. Su representación gráfica puede verse en la figura 8. El análisis estadístico de la morfología de las cabezas espermáticas mostró que aumentaba el porcentaje de cabezas normales junto con el avance del proceso selectivo ($P < 0,05$). Los porcentajes de cabezas normales y de colas normales en la suspensión de espermatozoides retenida en la columna de separación resultaron significativamente menores que los hallados en la fracción celular seleccionada ($P < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas a lo largo de la selección para las demás características estudiadas.

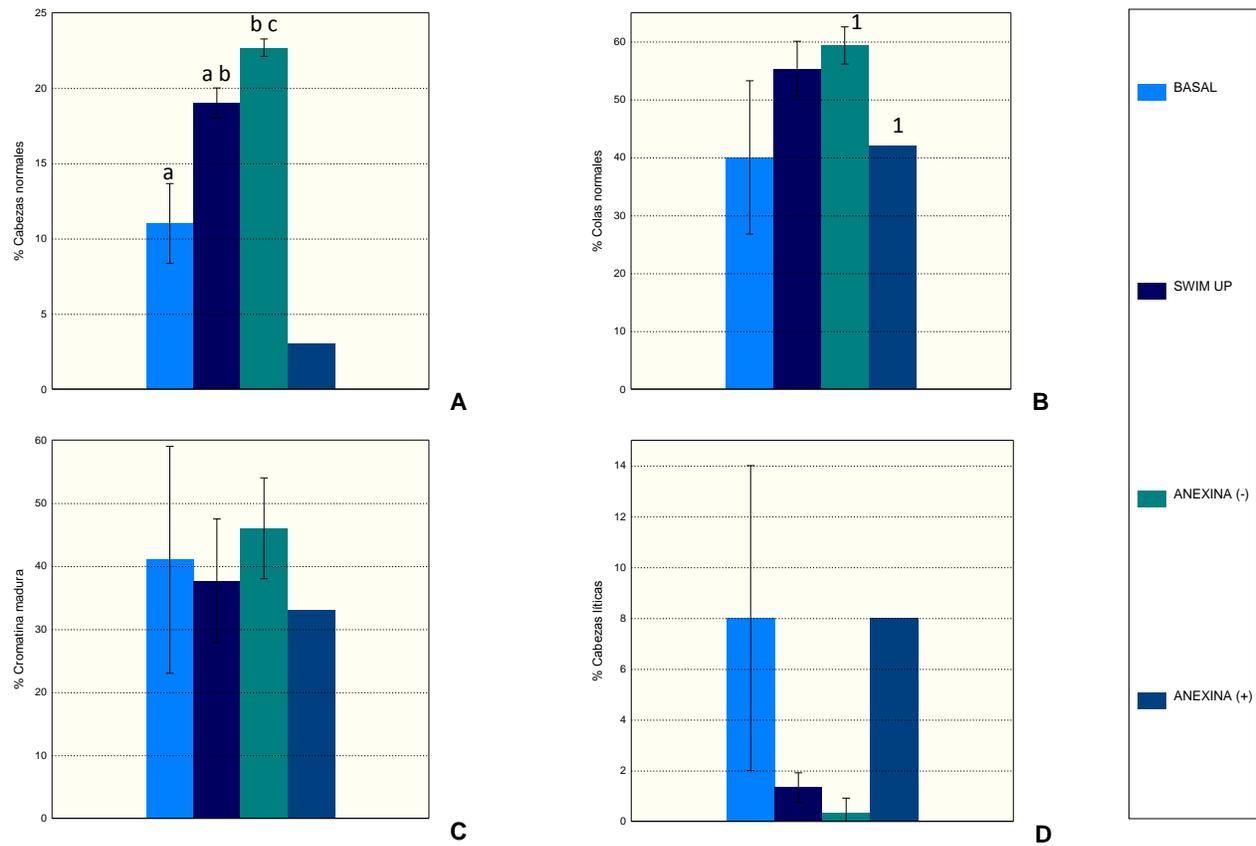


Fig. 8 – Swim-up/MACS-Anexina-V y ultraestructura. Histogramas del porcentaje de espermatozoides con la característica ultraestructural estudiada por MET según la etapa de la selección por swim-up/MACS-Anexina-V. **A)** Cabezas normales; **B)** Colas normales; **C)** Cromatina madura; **D)** Cabezas líticas. Las barras de error corresponden al desvío estándar. Las barras con subíndices iguales difieren significativamente entre sí ($P < 0,05$).

Tabla 3 – Resultados del estudio ultraestructural de los espermatozoides por MET durante la selección espermática usando swim-up/MACS-Anexina-V. Las columnas representan las etapas del proceso de selección mientras que en las filas se detallan las características ultraestructurales estudiadas. Los resultados se presentan como media de porcentajes±desvío estándar salvo en la columna “ANEXINA (+)” donde los desvíos estándar son cero. Los valores con subíndices iguales difieren significativamente entre sí ($P<0,05$).

		BASAL	SWIM UP	ANEXINA (-)	ANEXINA (+)
CABEZA	NORMAL	11,00 ± 2,65 ^a	19,00 ± 1,00 ^{ab}	22,67 ± 0,58 ^{abc}	3 ^c
	ANORMAL	89,33 ± 2,89	81,00 ± 1,00	75,67 ± 3,21	97
	LÍTICA	8,00 ± 6,00	1,33 ± 0,58	0,33 ± 0,58	8
	BINUCLEADA	1,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,58	0
	RESTOS CIT.	17,00 ± 5,29	19,00 ± 5,29	14,67 ± 5,77	7
CROMÁTINA	COMPACTA MADURA	41,00 ± 18,00	37,67 ± 9,81	46,00 ± 8,00	33
	GRANULAR INMADURA	39,67 ± 3,06	42,33 ± 8,62	38,67 ± 10,69	31
	VACUOLAS/RAREF.NUCL.	25,00 ± 8,89	23,67 ± 11,24	23,00 ± 7,00	29
ACROSOMA	NORMAL	43,00 ± 14,00	63,00 ± 13,89	59,67 ± 10,21	21
	ANORMAL	56,67 ± 13,32	36,00 ± 13,89	40,67 ± 9,87	79
	FORMA ALTERADA	20,00 ± 9,85	11,67 ± 5,86	12,00 ± 1,00	6
	DESPL/FESTONEADO	9,67 ± 4,62	10,00 ± 2,00	11,67 ± 2,52	4
	MINIACROSOMA	2,33 ± 0,58	1,67 ± 1,15	2,67 ± 0,58	1
	REACC/VACUOL/C.DISPER	19,33 ± 16,20	10,67 ± 6,81	12,33 ± 9,29	61
	AUSENTE	5,00 ± 7,00	2,00 ± 1,00	2,00 ± 1,00	7
COLA	NORMAL	40,00 ± 13,23	55,33 ± 4,73	59,33 ± 3,21 ^d	42 ^d
	ANORMAL	60,00 ± 13,23	44,67 ± 4,73	40,67 ± 3,21	58
	ELEM.SUPERNUMERARIOS	20,33 ± 5,03	20,67 ± 11,59	24,00 ± 6,24	11
	PARES AUSENTES	9,33 ± 4,51	6,00 ± 1,00	4,67 ± 4,73	11
	9+0	4,67 ± 2,08	2,33 ± 2,31	4,00 ± 2,65	9
	DESORG. TOTAL	14,33 ± 2,52	4,67 ± 3,06	3,33 ± 2,31	15
	DESPLAZ. AXONEMAL	2,00 ± 1,00	8,33 ± 5,51	1,67 ± 0,58	7
	HEMIAXONEMA	11,00 ± 3,61	2,00 ± 1,00	2,67 ± 2,89	6

Relación entre la morfología espermática según criterios de Tygerberg y las características ultraestructurales de la cabeza.

El estudio de correlación entre la morfología evaluada según criterios estrictos de Tygerberg y el porcentaje de cabezas normales según MET muestra que estos dos parámetros tienden a asociarse de manera positiva ($r=0,594$; $P=0,07$). (Figura 9) No se encontraron asociaciones entre la morfología según Tygerberg y las demás características de la cabeza estudiadas por MET (enumeradas en la tabla 3).

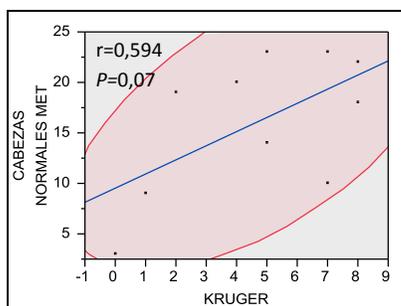


Fig. 9 – Relación entre la morfología según Tygerberg y el porcentaje de cabezas normales según MET. Diagrama de dispersión donde con el resultado de la correlación entre el porcentaje de espermatozoides normales según Tygerberg (KRUGER) y según MET. $n=10$ (r , coeficiente de correlación de Pearson)

Relación entre la fragmentación del ADN espermático y las características ultraestructurales.

Se analizaron las asociaciones entre el índice de fragmentación del ADN medido por el test SCD con las características ultraestructurales de los espermatozoides evaluadas por MET. Se halló que dicho índice y el porcentaje de cabezas ultraestructuralmente normales se correlacionan

negativamente y que ésta correlación es francamente evidente y estadísticamente significativa ($r = -0,916$; $P < 0,0003$). (Figura 10A) Con el porcentaje de espermatozoides líticos el índice de fragmentación del ADN se relaciona positivamente ($r = 0,835$; $P < 0,003$). (Figura 10B) Con el porcentaje de colas ultraestructuralmente normales, el índice de fragmentación del ADN de nuevo se asocia en forma negativa ($r = -0,873$; $P < 0,002$). (Figura 10C) Entre los demás parámetros ultraestructurales estudiados y el índice de fragmentación del ADN no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa.

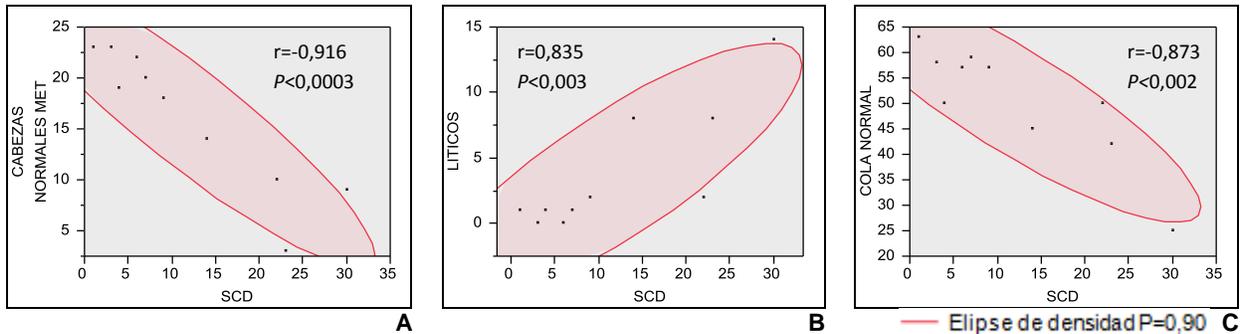


Fig. 10 – Relación entre la fragmentación del ADN y las características ultraestructurales. Diagramas de dispersión en donde se muestran los resultados de los análisis de asociación entre el índice de fragmentación del ADN espermático medido por el test SCD y el porcentaje de cabezas normales (A); el porcentaje de espermatozoides líticos (B); y el porcentaje de colas normales (C); los tres parámetros estudiados por MET. $n = 10$
(r , coeficiente de correlación de Pearson)

Relación entre la motilidad espermática progresiva y las características ultraestructurales de la cola.

Se estudiaron las características ultraestructurales de la cola evaluadas por MET y la motilidad progresiva de los espermatozoides en búsqueda de asociaciones entre ellas. Se encontró que la motilidad progresiva se correlaciona negativamente y de forma significativa con algunas anomalías ultraestructurales de la cola que refieren a la organización de las fibras del flagelo como la ausencia de algún par de microtúbulos ($r = -0,560$; $P < 0,02$; Figura 11A), la ausencia del par central (configuración 9+0) ($r = -0,632$; $P < 0,05$; Figura 11B) y la desorganización total del axonema ($r = -0,632$; $P < 0,05$; Figura 11C).

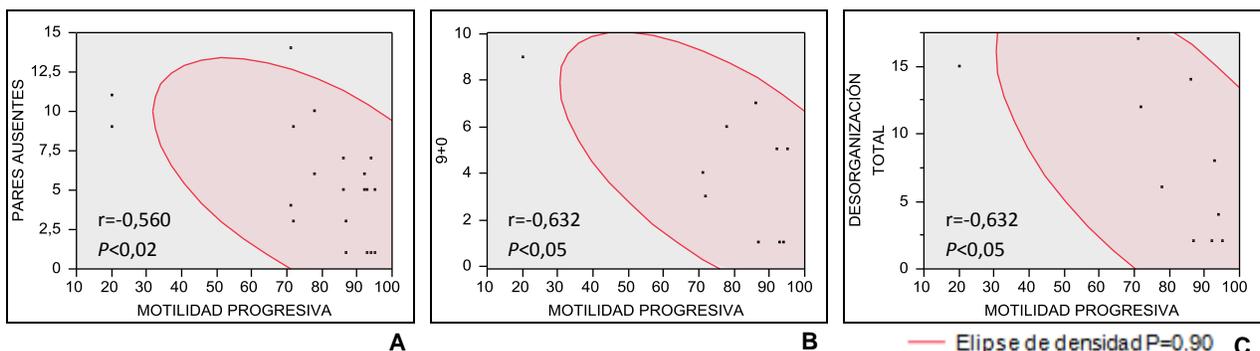
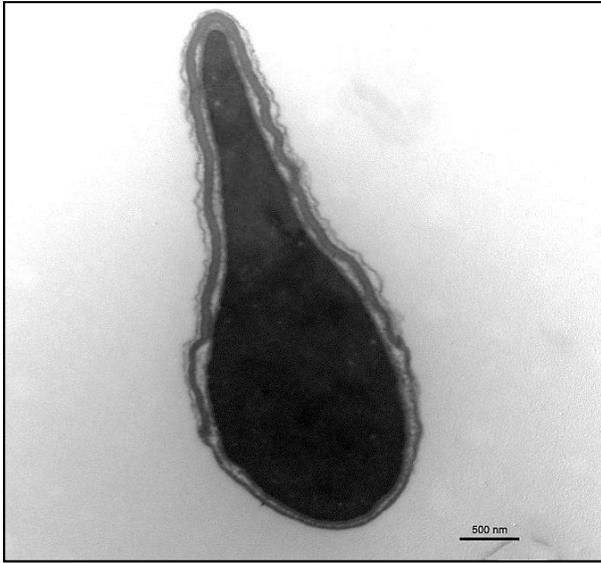
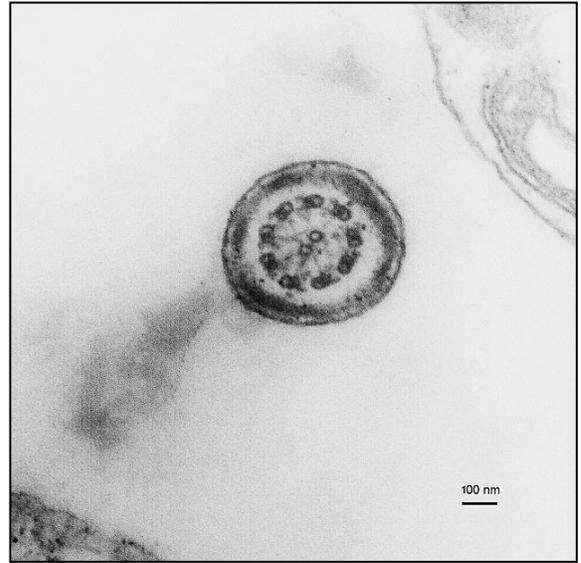


Fig. 11 – Relación entre anomalías ultraestructurales de la cola y la motilidad progresiva. Diagramas de dispersión que grafican los resultados del análisis de correlación de la motilidad progresiva con la ausencia de pares microtubulares en el flagelo (A); la ausencia del par central (B); y la desorganización total del axonema (C). En A, $n = 20$; en B y C $n = 10$.
(r , coeficiente de correlación de Pearson)

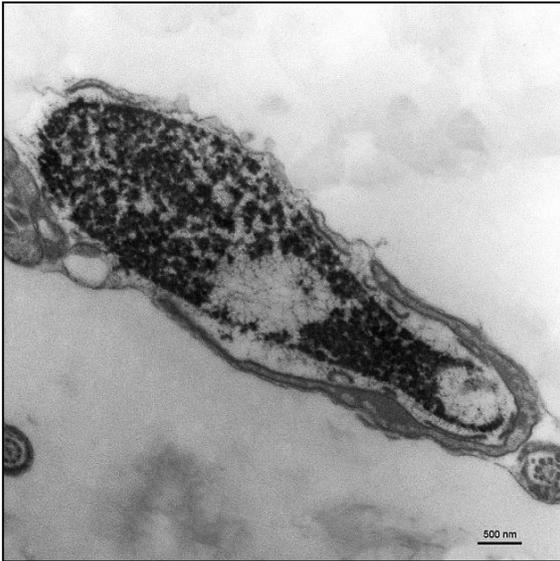
En los últimos 3 apartados el “n” de los estudios de asociación es 10 ya que se realizaron incluyendo todas las muestras con análisis ultraestructural sin importar la fracción del proceso de selección.



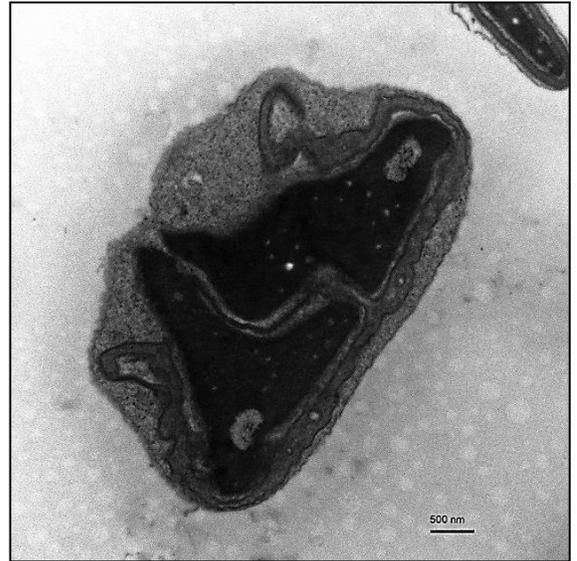
12.1



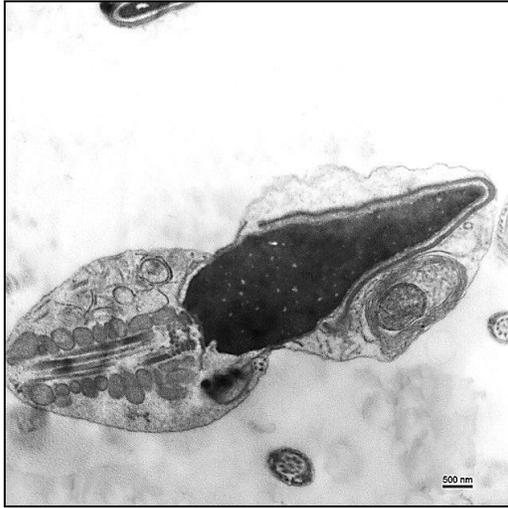
12.2



12.3



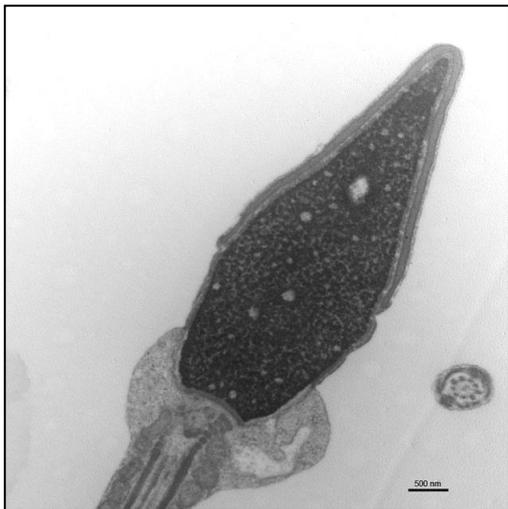
12.4



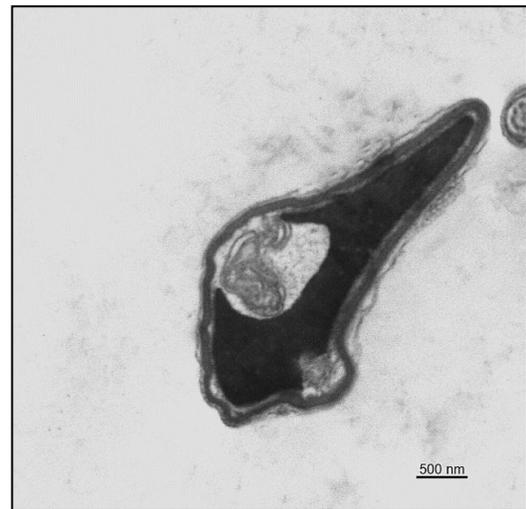
12.5



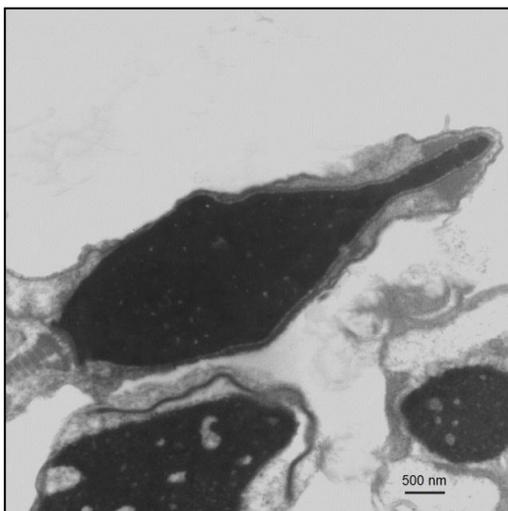
12.6



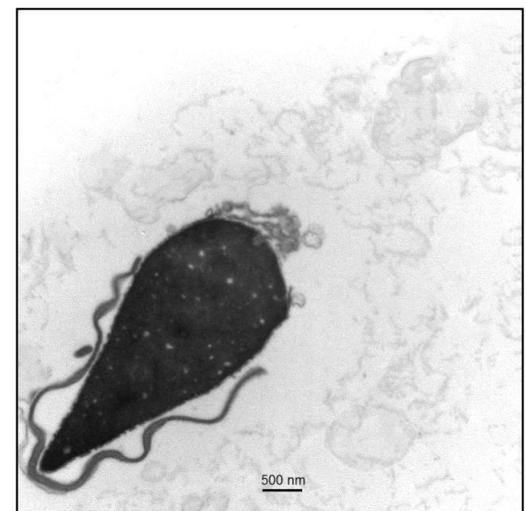
12.7



12.8



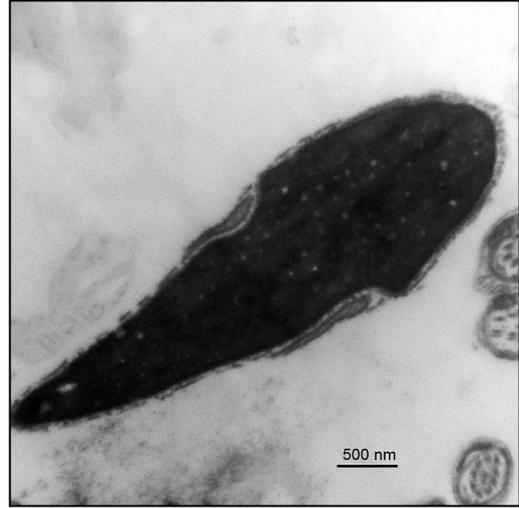
12.9



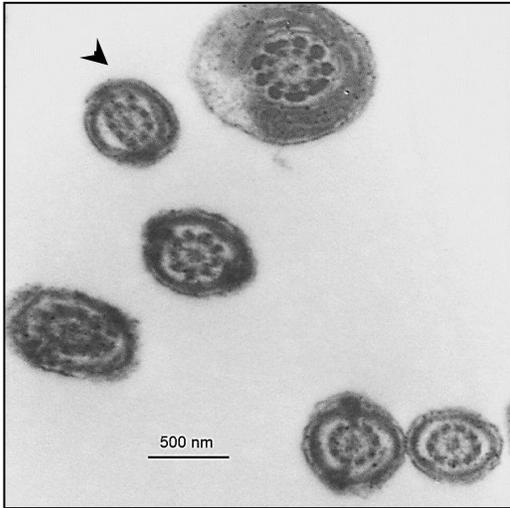
12.10



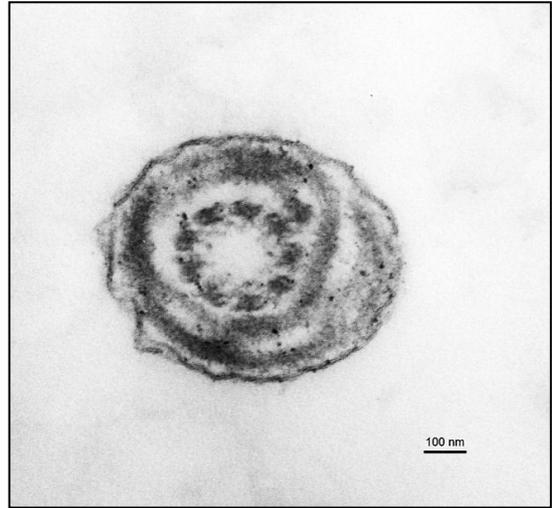
12.11



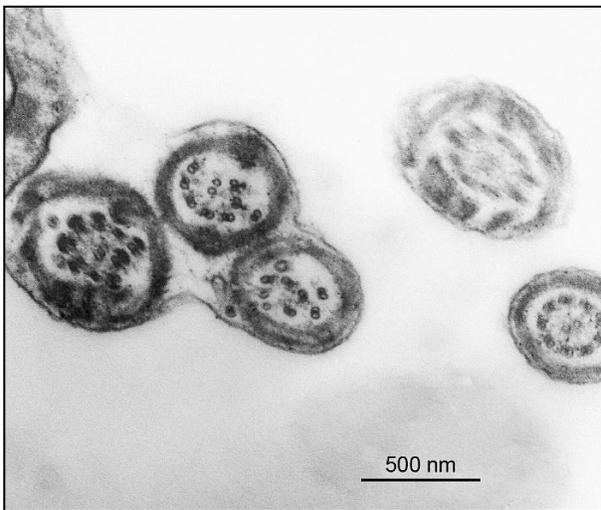
12.12



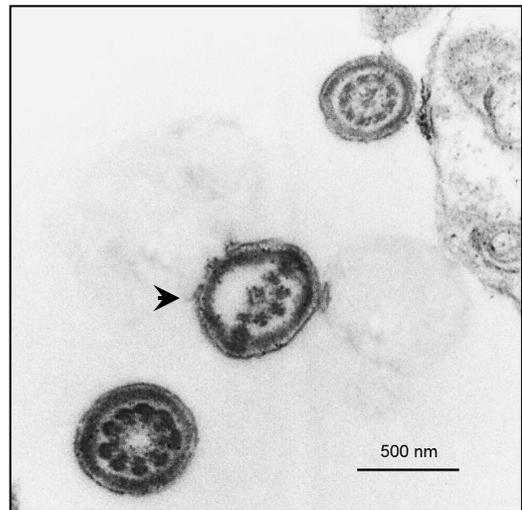
12.13



12.14



12.15



12.16

Figura 12 – Micrografías electrónicas.

12.1 – Cabeza normal

12.2 – Cola normal

12.3 – Cabeza lítica

12.4 – Cabeza binucleada

12.5 – Espermatozoide con restos citoplasmáticos y de membranas

12.6 - Cromatina compacta madura. A pesar de la madurez de la cromatina este espermatozoide es anormal (nótese la invaginación del acrosoma)

12.7 – Cromatina granular inmadura. Pese a su morfología correcta, este espermatozoide se califica como anormal por la inmadurez de su cromatina.

12.8 – Espermatozoide con rarefacciones nucleares (vacuolas intranucleares)

12.9 – Acrosoma con alteraciones de forma

12.10 – Acrosoma desplazado/festoneado. El acrosoma claramente se ve desplazado de su posición normal.

12.11 – Miniacrosoma. Las puntas de flecha indican los límites del acrosoma que cubre menos del 40% de la cabeza.

12.12 – Acrosoma reaccionado. La punta de flecha indica restos/vacuolas acrosómicos.

12.13 – Cola con elementos supernumerarios. La cola con el par supernumerario está señalada con la punta de flecha.

12.14 – Cola con configuración microtubular 9+0. La punta de flecha señala un par supernumerario presente en este flagelo.

12.15 – Desorganización total de la cola. A la izquierda de esta micrografía se ven tres flagelos cuya configuración microtubular es de desorganización total. En la esquina inferior derecha puede verse una cola normal.

12.16 – Hemiaxonema. En el centro de la micrografía se ve un hemiaxonema señalado con la punta de flecha. También puede verse una cola normal (arriba) y un flagelo “9+0” (abajo).

DISCUSIÓN

La fragmentación del ADN espermático es un parámetro que se incluyó en el estudio seminal de rutina hace relativamente poco tiempo y no se cuenta con valores de corte claramente establecidos (Makhlof y Niederberger, 2006). Tanto es así que la última edición del manual de la OMS poco dedica a este tema y no está incluida su determinación dentro de los ensayos de rutina recomendados (WHO, 2010). Quizás por falta de comprensión sobre el significado de este daño en los pacientes concretos, en la clínica andrológica se ha generado cierto escepticismo (especialmente en nuestro medio) respecto a la necesidad de analizar este tipo de alteraciones. A pesar de ello, Aitken y De Iuliis (2010) recomiendan que el estudio del daño del ADN espermático en un paciente infértil debería ser considerado debido a que constituye un factor de riesgo que atenta contra el normal desarrollo de los embriones y posiblemente también de su progenie.

Dependiendo del tipo de daño, de cuándo éste es producido durante el desarrollo espermático, o de la región del genoma afectada, el embrión puede repararlo antes de su primera división mitótica con relativa eficiencia. Así, las probabilidades de que en la generación F1 aparezca un fenotipo producto del daño en el ADN introducido por el espermatozoide no son altas (se estima 1 en 100.000), pero el hecho de que nazcan niños normales tras TRA con espermatozoides con ADN dañado no significa necesariamente que sean genética o epigenéticamente normales o que

el daño no genere cambios fenotípicos en generaciones futuras. (Revisado en Aitken y De Iuliis, 2010).

Las técnicas desarrolladas para la evaluación de la fragmentación del ADN en espermatozoides difieren en el modo en que evidencian el daño cromatínico, en el equipamiento que requieren y en la interpretación del resultado que proveen (Gosálvez *et al.*, 2006). En este trabajo se eligieron dos por su bajo costo y su procedimiento rápido y sencillo. Al intentar relacionar los resultados de ambas técnicas aplicadas sobre las mismas muestras con la motilidad progresiva encontramos una correlación inversa con el test SCD y una tendencia directa con NA. Siendo la motilidad un parámetro evidente de calidad de una muestra espermática, tiene sentido que las muestras con más bajos porcentajes de espermatozoides móviles presenten mayor cantidad de espermatozoides con su ADN dañado. Además otros autores han reportado esto mismo evaluando la fragmentación del ADN espermático mediante la técnica de TUNEL (Ramos y Wetzels, 2001; Duran *et al.*, 2002; Mahfouz *et al.*, 2010) Teniendo en cuenta la morfología, no encontramos asociaciones estadísticamente significativas con ninguna de las dos metodologías de detección de daño empleadas.

No se encontró relación entre los resultados de ambos test aplicados sobre las mismas muestras. Tampoco se vio la disminución post-*swim-up* del índice de fragmentación observada por SCD cuando se determinó por NA (dato no mostrado), hecho que refuerza la idea de que ambas técnicas no se correlacionan.

Surge entonces la interrogante de cuál de los dos ensayos es más confiable. De acuerdo con la base de ambas técnicas, el test de NA evidencia fracturas en el ADN de un modo más directo que el test SCD, por lo que sería correcto pensar que los resultados del primero reflejan más la realidad de la integridad cromatínica que los del segundo. Como ya se vio, el test SCD marca roturas en el ADN de forma indirecta, basándose en la decondensación diferencial de la cromatina dañada con respecto a la cromatina intacta, mientras que el naranja de acridina es un intercalante que al asociarse con ADN monocatenario fluoresce en rojo y con ADN nativo se asocia como monómeros que fluorescen en verde. La visualización de los espermatozoides tratados con el test SCD no requiere de equipos con fluorescencia, y la discriminación entre los espermatozoides con y sin daño en su ADN es sencilla y muy evidente. (Figura 3C) No ocurre lo mismo con el test de NA, donde la fluorescencia pocas veces es verde o roja/anaranjada como se ve en la figura 3B. En su lugar, la señal se presenta en una gama de tonalidades entre los colores mencionados, dificultando enormemente la distinción de los espermatozoides cuyo ADN está sano de aquellos en los que no lo está, aumentando mucho la subjetividad del análisis. Por estas razones se eligió el test SCD para realizar el resto del trabajo. Esto no quiere decir que ambas técnicas no puedan ser complementarias una vez que se entiendan más los mecanismos que subyacen a la fragmentación del ADN espermático, ya que más allá de la subjetividad, los distintos resultados observados podrían ser explicados por las bases moleculares de naturaleza diferente de cada una de las técnicas.

Para su uso en TRA y muchas veces con fines diagnósticos, las muestras de semen deben ser procesadas para separar a los espermatozoides del plasma seminal o para seleccionar espermatozoides en base a algún parámetro. Cada laboratorio según su experiencia, teniendo en cuenta el uso que se le vaya a dar a la muestra de semen y sus características, tiene establecida la técnica de procesamiento a emplear con la misma. Para esta segunda parte se utilizó la técnica de *swim-up* convencional por ser la de uso de rutina de muchos laboratorios, incluido el del centro de donde se reclutaron los pacientes de este trabajo.

Los resultados indican que la preparación de semen mediante *swim-up* disminuye significativamente el índice de fragmentación del ADN espermático de la muestra seleccionada respecto de la muestra de partida. Esta mejora además es muy eficiente, ya que las muestras con índices de fragmentación más elevados presentan una disminución más notable que aquellas con índices de fragmentación basales más pequeños.

Además, encontramos que la influencia de la edad del paciente en la integridad del ADN de sus espermatozoides solamente se hace evidente cuando la fragmentación es evaluada luego del procesamiento de la muestra. Los análisis bivariados de la edad del paciente y los índices de fragmentación indican que el daño en el ADN de los espermatozoides tiende a aumentar conforme avanza la edad y esta tendencia es clara y significativa cuando la integridad de la cromatina se evalúa luego de la preparación del semen por *swim-up*. A su vez podría decirse que la disminución del porcentaje de espermatozoides con daño en su ADN producto de la selección espermática del *swim-up* tiende a ser menor a medida que la edad aumenta. La relación entre edad de los pacientes y daño del ADN espermático se debe tener en cuenta en el manejo del hombre infértil, especialmente cuando se utilizan TRA. Recientes descubrimientos señalan que el uso en TRA de muestras de semen de pacientes añosos que presentan daño en el ADN de los espermatozoides está asociado con la aparición en la descendencia de trastornos neurológicos poligénicos como epilepsia, esquizofrenia espontánea, autismo y enfermedad bipolar (Aitken y De Iuliis, 2010).

Cuando analizamos la morfología espermática de la fracción basal respecto de la fragmentación del ADN, observamos que muestras con bajos porcentajes de espermatozoides normales tienden a presentar índices de fragmentación del ADN elevados. Esta tendencia se acentúa cuando la fragmentación se evalúa luego de la selección de espermatozoides por *swim-up*. Pese a ello, ninguna de estas tendencias fue estadísticamente significativa. Estos resultados concuerdan con la idea de que la relación entre la fragmentación del ADN y la morfología espermática no es aún del todo clara (Winkle *et al.* 2009; Avendano y Oehninger, 2010).

En lo que tiene que ver con la motilidad, corroboramos la existencia de una fuerte relación entre esta y la fragmentación del ADN. Como se mencionó más arriba, la movilidad es el más claro signo de vitalidad del espermatozoide. Si bien individualmente no tiene por qué haber una relación entre movilidad y calidad de la célula, se acepta que muestras de semen que presentan alta motilidad espermática son de mejor calidad que muestras con baja motilidad (Bartoov *et al.*, 1991; Donnelly *et al.*, 1998). No extraña entonces que muestras con buenos porcentajes de espermatozoides móviles presenten bajos niveles de fragmentación del ADN espermático. Además vemos que el *swim-up*, separando espermatozoides en base a su movilidad, los selecciona también reduciendo el índice de fragmentación del ADN de la muestra de semen. Esto sugiere la existencia de alguna relación entre la integridad cromatínica y la cinemática de éstas células.

En las TRA y sobre todo en el ICSI la “selección natural” del espermatozoide que se da durante el proceso de fecundación *in vivo* debe ser sustituida por métodos de selección espermática *in vitro*. En ese sentido y buscando la optimización de esta “selección artificial”, testamos en este trabajo la aplicación de MACS-Anexina-V en combinación con la técnica de *swim-up*.

El análisis de la motilidad y la morfología espermáticas durante el proceso de selección realizado, permite observar que esta separación mejora ambos parámetros.

El incremento significativo en la motilidad está dado por el primer paso de la selección (el *swim-up*). Luego del pasaje a través de la columna los espermatozoides sufren una dramática disminución de su motilidad (datos no mostrados) posiblemente debido al estrés generado por la suma de varios factores a los que son sometidos durante dicho pasaje. Estos son el campo magnético del imán, la composición de naturaleza pobre del medio en el que están suspendidos los espermatozoides (*binding buffer*⁵) y la disminución de la temperatura que las células experimentan (la suspensión producto de la selección por *swim-up* se encuentra a 37°C, luego la incubación en *binding buffer* con las microesferas y el pasaje por la columna se realizan a temperatura ambiente⁴). Tras lavar el *binding buffer*, sustituirlo con mHTF-SSS, e incubar la suspensión a 37°C, al cabo de un tiempo los espermatozoides recuperan la movilidad, aunque no logran igualar la motilidad de la suspensión al ingresar en la columna. (Tabla 2) Pese a esto, la tendencia en el proceso completo es de un marcado aumento de éste parámetro.

El porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales según criterios estrictos tendió a aumentar durante el transcurso de la selección. Esta tendencia se hace más fuerte cuando los espermatozoides luego del *swim-up* son seleccionados por MACS-Anexina-V.

Se evaluó también el comportamiento del índice de fragmentación del ADN espermático durante el proceso de selección. A partir de los resultados de la segunda parte de este trabajo sabíamos que el *swim-up* por sí solo mejoraba significativamente este índice. En las muestras tratadas con el proceso de selección *swim-up*/MACS-Anexina-V observamos nuevamente esta mejora, que se acentuó (aunque no significativamente) tras el pasaje de la fracción seleccionada por *swim-up* a través de las columnas.

Al comparar estos tres parámetros (motilidad, morfología y fragmentación del ADN) en las fracciones ANEXINA (-) y ANEXINA (+) observamos que la motilidad y la morfología son notoriamente menores en la fracción ANEXINA (+), mientras que el índice de fragmentación del ADN de sus espermatozoides es francamente mayor. Se puede afirmar entonces que la técnica de MACS-Anexina-V separa de manera eficiente los espermatozoides teniendo en cuenta estas características.

La mejora significativa de la morfología de las cabezas a lo largo de la selección observada en el estudio ultraestructural de las fracciones, refuerza la validez de la marcada tendencia mencionada anteriormente de la morfología según criterios estrictos analizada por microscopía óptica. Pese a esto, según nuestros resultados, estas dos variables no se correlacionan significativamente (Figura 9). Cabe destacar que el porcentaje de cabezas ultraestructuralmente normales y la fragmentación del ADN se relacionan casi linealmente.

Por otro lado, el porcentaje de colas ultraestructuralmente normales tiende a aumentar durante el proceso selectivo, correspondiéndose con el aumento de la motilidad progresiva hallado. Según nuestros resultados ambas características están muy fuertemente asociadas, y para las dos se observa un salto importante entre la fracción basal y el producto de la selección por *swim-up*, lo que es coherente si se tiene en cuenta que la técnica de *swim-up* separa espermatozoides según su motilidad. Es esperable que los espermatozoides que presenten anomalías ultraestructurales en su flagelo presenten también trastornos cinemáticos, y por lo tanto no sean seleccionados por *swim-up*. De hecho encontramos que anomalías severas del flagelo como la ausencia de pares microtubulares, en especial del par central, y la desorganización total del axonema, se asocian negativamente con la motilidad progresiva. Además el porcentaje de colas ultraestructuralmente

⁵ Ver el apartado "Separación de espermatozoides por MACS" en la sección "MATERIALES Y MÉTODOS".

normales está significativamente disminuido cuando la muestra presenta índices de fragmentación del ADN espermático elevados, ya que observamos una relación fuertemente inversa entre ambas medidas. Reforzamos con este dato la idea de que existe una relación entre la cinemática del espermatozoide y la integridad de su ADN. Esta relación sería la responsable de la mejora en el índice de fragmentación observada luego del procesamiento por *swim-up*.

La mejora en el índice de fragmentación mencionada en el párrafo anterior tiende a acentuarse luego de la separación por MACS-Anexina-V, de modo que globalmente en el proceso de selección la fragmentación del ADN de una muestra de semen disminuye sensiblemente. Según nuestros resultados este proceso no influye sobre la madurez cromatínica observada por MET, aunque la presencia de rarefacciones nucleares, y el porcentaje de espermatozoides líticos, tenderían a disminuir durante la selección. (Tabla 3). Estos parámetros teóricamente podrían relacionarse con la fragmentación del ADN, y en este trabajo corroboramos la existencia de una correlación directa entre esta característica y el porcentaje de espermatozoides líticos. La fragmentación del ADN y la lisis celular son ambos eventos presentes en vías de muerte celular (Williams *et al.*, 1974; Cragg *et al.*, 2000), por lo que no sorprende la correlación hallada siendo que se espera que el proceso de selección utilizado deje atrás células necróticas o apoptóticas por el fundamento de la técnica de separación por MACS-Anexina-V. Nuestros datos sugieren que se debería ser cuidadoso antes de aplicar una técnica como MACS-Anexina-V en la clínica, teniendo en cuenta la alteración de la movilidad que sufren los espermatozoides tras el pasaje por el magneto y el hecho de que aproximadamente en el 10% de los espermatozoides seleccionados se observan por MET microesferas adheridas (dato no mostrado que difiere con lo planteado por otros autores (Rawe *et al.*, 2010; Paasch *et al.*, 2003)).

CONSIDERACIONES FINALES

En este trabajo se han estudiado pruebas que analizan la integridad del ADN espermático y métodos de selección de espermatozoides que o bien no se han implementado en la rutina de diagnóstico y tratamiento del hombre infértil, o se están implementando aún en fase de experimentación y con resultados a lo sumo controvertidos.

Si bien de aquí no se desprende si incluir una u otra técnica de detección de daño del ADN espermático actúa en beneficio del estudio del paciente infértil, ambas podrían dar información complementaria y creemos que estudios como éste son importantes con el fin de validar tecnologías en la práctica diagnóstica clínica sobre todo en nuestro medio para lograr consensos y establecer referencias locales.

Con respecto a las técnicas de separación espermática este trabajo deja ver que el *swim-up* convencional parece ser una excelente técnica de selección y que no serían necesarias metodologías sofisticadas y/o costosas para mejorar la calidad espermática. Pese a que la base teórica de la selección por MACS-Anexina-V es muy prometedora, existen consideraciones importantes antes de sugerir la aplicación de la misma en la práctica clínica. Creemos necesario el análisis de un mayor número de casos y el perfeccionamiento de la técnica introduciendo variantes con el objetivo de disminuir el porcentaje de microesferas adheridas a los espermatozoides seleccionados y minimizar el estrés que ocasiona la pérdida de la motilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken J.R. y De Iuliis G.N. 2007. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive BioMedicine Online* (14) 727-733.
- Aitken J.R. y De Iuliis G.N. 2010. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* (16) 3-13.
- Aitken J.R., De Iuliis G.N., McLachlan R.I. 2008. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology* (32) 46-56.
- Aitken R.J. 2006. Sperm function tests and fertility. *International Journal of Andrology* (29) 69-75.
- Aitken R.J. y Krausz C.G. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* (122), 497-506.
- Aitken J.R., Koopman P., Lewis S.E. 2004. Seeds of concern. *Nature* (432), 48-52.
- Arangino V., Del Giacco G.S. 1995. Metodiche di separazione linfocitaria. En: Dammacco F. editor. Diagnostica immunologica. Estratto da Trattato italiano di medicina di laboratorio Diretto dal Prof. A. Burlina. Italy: Piccin Nuova Libreria s.p.a. P 57-75
- Avendano C., Oehninger S. 2010. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *Journal of Andrology* (Nov. 18, Epub. Ahead of print).
- Barroso G., Morshedi M., Oehninger S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction* (15) 1338-1344.
- Bartoov B., Ben-Barak J., Sneider M., Yogev L., Lightman A. 1991. Sperm motility index: a new parameter for human sperm evaluation. *Fertility and Sterility* (56) 108-112.
- Benchaib M., Braun V., Lornage J. et al. 2003. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate un assisted reproductive technique. *Human Reproduction* (18), 1023-1028.
- Bjorndahl L., Mohammadieh M., Pourian M., Soderlund I., Kvist U. 2005. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *Journal of Andrology* (26) 170-173.
- Bungum M., Humaidan P., Spano M., Jepson K., Bungum L., Giwercman A. 2004. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reproduction* (19) 1401-1408.
- Coetzee K. y Kruger T.F. 2007. Advances in automated sperm morphology evaluation. *Male Infertility*. Cap. 10. 171-180. Informa UK Ltd.
- Cortés-Gutiérrez E.I., Dávila-Rodríguez M.I., López-Fernández C., Fernández J.L., Gosálvez J. 2007. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urología Española*. (31) 98-109.
- Cragg M.S., Howatt W.J., Bloodworth L., Anderson V.A., Morgan B.P., Glennie M.J. 2000. Complement mediated cell death is associated with DNA fragmentation. *Nature-Cell Death & Differentiation*. (7) 48-58.
- Chemes H.E., Rawe V. Y. 2003. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update* (9) 405-428.
- Chohan K.R., Griffin J.T., Lafromboise M., DeJonge Ch.J., Carrell D.T. 2006. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology* (27) 53-59
- Dey S.K. (2010) How we are born. *J Clin Invest*. (120) 952-955.
- Dirican E.K., Özgün O.D., Akarsu S., Akin K.O., Ercan Ö., Ugurlu, Çamsari Ç., Kanyilmaz O., Kaya A., Ünsal A. 2008. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J. Assisted Reproduction Genet*. (25) 375-381.
- Donnelly E.T., Lewis S.E.M., McNally J.A., Thompson W. 1998. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and Sterility* (70) 305-314.
- Duran E.H., Morshedi M., Taylor S., Oehninger S. 2002. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction* (17), 3122-3128.
- Eggert-Kruse W., Rohr H., Kerbel H., Schwabach B., Demirakca T., Klinga K., Tilgen W., Runnebaum B. 1996. The Acridine Orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? *Human Reproduction* (11) 784-789.
- Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., Zinaman M.J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P., Claussen O.P. 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 1039-1049.

- Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K. 2002. Sperm Chromatin Structure Assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* (23) 25-43.
- Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C. 2007. Male infertility: role of genetic background. *Reproductive BioMed Online* (14) 734-745.
- Fernández J.L., Muriel L., Goyanes V., Segrelles E., Gosálvez J., Enciso M., LaFromboise M., De Jonge C. 2005. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility* (84) 833-842.
- Fernández J.L., Muriel L., Rivero M.T., Goyanes V., Vázquez R., Alvarez J.G. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology* (24) 59-66.
- Fernández J.L., Vázquez-Gundin F., Delgado A., Goyanes V., Ramiro-Díaz J., De la Torre J., Gosálvez J. 2000. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in Human spermatozoa: technical variants evidences different structural features. *Mutation Research* (253) 77-82.
- Gorczyca W., Gong J., Darzynkiewicz Z. 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research* (53) 1945-1951.
- Gosálvez J., Fernandez J.L., Goyanes V., Lopez-Fernandez. 2006. Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina. *Biotech Magazine* 24-37.
- Hurst R.E. y Roy J.B. 1985. Acridine orange male fertility test. *Fertility and Sterility*. (43) 154-155.
- Kruger T.F. y Franken D.R. 2004. Atlas of human sperm morphology evaluation. UK: Taylor & Francis Group. 86 p.
- Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S., Lombard C.J., Van der Merwe J.P., van Zyl J.A., et al. 1986. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* (46) 1118-1123.
- Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A., Meriano J., Casper R.F. 1998. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* (69) 528-532.
- Mahfouz R., Sharma R., Thiyagarajan A., Kale V., Gupta S., Sabanegh E., Agarwal A. 2010. Semen Characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertility and Sterility*. (94) 2141-2146.
- Makhlouf A.A. y Niederberger C. 2006. DNA integrity tests in clinical practice: it is not a simple matter of black and white (or red and green). *Journal of Andrology*. (27) 316-323.
- Menkveld R. 2007. The basic semen analysis. En: Oehninger S.C. y Kruger T.F., editors. Male Infertility. Diagnosis and Treatment. UK: Informa UK Ltd. P 141-170
- Oehninger S., Arslan M., Franken D.R. 2007. Sperm-zona pellucida binding assays. En: Oehninger S.C. y Kruger T.F., editors. Male Infertility. Diagnosis and Treatment. UK: Informa UK Ltd. P 209-223.
- Oehninger S., Franken D.R., Sayed E., Barroso G., Kolm P. 2000. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Human Reproduction Update* (6) 160-168.
- Ombelet W., Bosmans E., Janssen M., Cox A., Vlasselaer J., Gyselaers W., Vanderput H., Gielen J., Pollet H., Maes M., Steeno O., Kruger T. 1997. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Human Reproduction* (12) 987- 993.
- Paasch U., Grunewald S., Fitzl G., Glander H.J., 2003. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *Journal of Andrology* (24) 246-252.
- Ramos L. y Wetzels A.M.M. 2001. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Human Reproduction* (16) 1703-1707.
- Rawe V.Y., Uriondo Boudri H., Alvarez Sedó C., Carro M., Papier S., Nodar F. 2010. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* (20) 320-323.
- Said T., Agarwal A., Grunewald S., Rasch M., Baumann T., Kriegel Ch., Li L., Glander H.J., Thomas Jr. A.J., Paasch U. 2006. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biology of Reproduction* (74) 530-537.
- Said T.M., Agarwal A., Zborowski M., Grunewald S., Glander H.J., Paasch U. 2008b. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *Journal of Andrology* (29) 134-142
- Said T.M., Grunewald S., Paasch U., et al. 2005. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reproductive BioMedicine Online* (10) 740-746.

- Sakkas D., Urner F., Bizzaro D. et al. 1998. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproduction Supplement* (4), 11-19.
- Sánchez I., Mar C., Castilla J.A., Marcos M., Martín I., Galán A., Jiménez M.I., Moreno J.M., Serrano I., García-Cobaleda I., Aulesa C., Lozano V., Sánchez C., de Monserrat J. 2009. Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida. *Documentos de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular* Documento C. Fase 3. Versión 4. P 23- 26.
- Shamsi M.B., Kumar R., Dada R. 2008. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* (127) 115-123.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* (175) 184-191.
- Spano M., Bonde J., Hjollund H.I., Kolstad H.A., Cordelli E., Leter G. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertility and Sterility* (73) 43-50.
- Tarozzi N., Bizzaro D., Flamigni C., Borini A. 2007. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online* (14) 746-757.
- Vagnini L., Baruffi R.L.R., Mauri A.L., Petersen C.G., Massaro F.C., Pontes A., Olivera J.B.A., Franco Jr. J.G. 2007. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reproductive BioMedicine Online* (15) 514-519.
- van der Steeg JW., Steures P., Eijkemans MJ., Habbeman JD., van der Veen F., Bossuyt PM., Hompes PG., Mol BW. 2004. Should the post-coital test (PCT) be part of the routine fertility work-up? *Human Reproduction* (19) 1373-1379.
- Weng S.L., Taylor S.L., Morshedi M., Schuffner A., Duran E.H., Beebe S., Oehninger S. 2002. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction* (8) 984-991.
- WHO. 1999. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press. Fourth edition. 138 p.
- WHO. 2000. WHO manual for the standardized investigation diagnosis and management of the infertile male. Cambridge University Press. 102 p.
- WHO. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth Edition. Prepublication version. 271 p.
- Williams J.R., Little J.B., Shipley W. 1974. Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* (252) 754-755.
- Winkle T., Rosenbusch B., Gagsteiger F., Paiss T., Zoller N. 2009. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J. Assisted Reproduction Genet.* (26) 41-46.
- Zini A. y Libman J. 2006. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Current Opinion in Urology* (16), 428-432.
- Zini A., Bielecki R., Phang D., Zenzes M.T. 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility* (75) 674-677.