

Evaluación de la Fragmentación del •• DNA Espermático mediante el Test de Tunel. ••

Dra. Leticia Baccini / Dpto. de Endocrinología

ASPECTOS CLINICOS:

Cada vez más, la integridad del DNA espermático es reconocida como una medida independiente de su calidad y se sabe que es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a término tanto in vivo como in vitro.

El análisis del semen en el que se miden concentración, ph, volumen, movilidad y normalidad morfológica de los espermatozoides, continúa siendo la prueba clínica más importante para predecir infertilidad, sin embargo, no revela defectos en el espermatozoide que afecten a la integridad del genoma masculino. Por lo tanto, la evaluación del mismo, además del estudio de los parámetros sistemáticos seminales, podría aportar una información adicional acerca de la calidad del espermatozoide.

Normalmente, el daño al DNA puede ser reparado por el ovocito después de la fertilización. Ésto depende principalmente de la calidad citoplasmática y genotípica del óvulo, y del nivel de daño en las cadenas de DNA del espermatozoide que produjo la fertilización.

¿QUÉ ES EL DNA ESPERMÁTICO NORMAL?

El DNA espermático esta organizado de forma tal que mantiene la cromatina compacta y estable. Esta organización no solo permite que se encuentre muy bien empaquetado el material genético para ser transferido al huevo, sino que asegura que sea entregado en forma física y química tal, que contribuya al desarrollo del embrión haciendo más accesible la información genética. El espermatozoide fértil tiene un DNA estable, el cual es capaz de descondensarse en el momento apropiado del proceso de la fertilización y transmitir el DNA sin defectos.

ORIGEN DEL DAÑO AL DNA DE ESPERMATOZOIDES

El origen de las lesiones en el DNA del espermatozoide puede deberse a múltiples causas de tipo intrínseco o inducidas por factores externos.

Los factores intrínsecos incluyen:

- Selección ineficiente: La producción de espermatozoides se localiza en los túbulos seminíferos (testículos) y en algunos casos los espermatozoides y sus células progenitoras sufren alteraciones de tipo genético que resultan en roturas del DNA. Estos espermatozoides dañados son generalmente seleccionados y eliminados, pero si el mecanismo de selección falla aparecen espermatozoides con el DNA fragmentado en el eyaculado.
- Maduración incorrecta: Los espermatozoides sufren un proceso de maduración en epidídimo. Este proceso de maduración conlleva al empaquetamiento de la cromatina nuclear y la adquisición de la motilidad espermática. Si este proceso no se lleva a cabo correctamente se pueden producir lesiones en el DNA espermático.

Los factores externos incluyen:

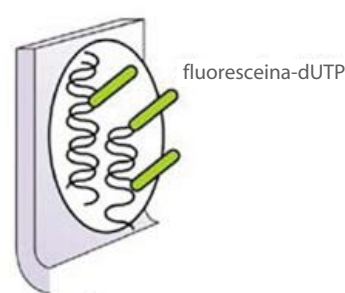
- Daño inducido por radio/quimioterapia.
- Varicocele.
- Episodio de fiebre alta.
- Exposición a elevadas temperaturas.
- Enfermedad inflamatoria aguda o crónica.
- El estrés oxidativo post testicular: Durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo se puede producir fragmentación del DNA espermático. Uno de los mecanismos principales es el relacionado con la producción de radicales libres, ya sea por espermatozoides inmaduros o por las células epiteliales del epidídimo, que dañan directamente el material genético del espermatozoide. Además, la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas por factores tóxicos y temperaturas elevadas también puede inducir fragmentación del DNA.

MÉTODOS PARA EVALUAR LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA

Por varios años los investigadores han buscado la mejor forma de cuantificar el daño presente en el DNA de espermatozoides humanos. Actualmente se dispone de varias técnicas que miden el daño al DNA en los mismos. Algunas evalúan la integridad del DNA y otros ensayos identifican defectos en el empaquetamiento de la cromatina espermática.

En nuestro laboratorio comenzamos a utilizar el Test de TUNEL (Terminal desoxi nucleotidil Uridin trifosfato, dUPT, deoxynucleotidil tranferase Nick-End Labelling assay), que es el test recomendado por líderes de opinión en estudios de fragmentación de DNA. Actualmente el valor de corte recomendado para este Test es del < 15 % o 30 %, según la metodología empleada.

Esta prueba permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos de las roturas existentes en el DNA, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se cataliza, in situ, mediante la acción de una tranferasa Terminal. Esta enzima incorpora deoxiuridina modificada con biotina o digoxigenina, en el extremo 3'-OH de la cadena afectada. El nucleótido incorporado esta directamente marcado con un fluorocromo. Teóricamente la señal de marcado obtenida por cada espermatozoide, se incrementaría de acuerdo con el número de roturas que presente la cadena de DNA.



DNA de células fijadas marcadas por el agregado de fluoresceína-dUTP a cadenas rotas por una enzima transferasa terminal.

Esta técnica ha tenido una muy buena aceptación dado que es versátil, está comercializada en kit y los resultados pueden ser interpretados mediante microscopia de fluorescencia y citometria de flujo.

UTILIDAD CLINICA

Este Test se recomienda en los siguientes casos:

- Infertilidad idiopática (de causa desconocida).
- Tras fallos repetidos en técnicas de reproducción asistida.
- Casos en los que se ha observado una mala calidad embrionaria.
- Pacientes que han sufrido abortos de repetición.
- Varicocele.
- Varones infértiles con edades superiores a los 40 años.
- Casos de congelación de semen (se comprueba que la muestra congelada tenga unos niveles de fragmentación aceptables).
- Episodio febril en los últimos 3 meses.

Los tipos de muestra que se emplean son semen eyaculado, semen post selección espermática, espermatozoides obtenidos por punción espermática o biopsia (TESA, TESE, MESA). Para la muestra de semen, el paciente deberá solicitar turno e indicaciones de preparación al laboratorio y para las muestras derivadas, remitir un volumen aproximado de 1,0 ml de semen entero homogeneizado dentro de las 2 horas de obtenido.

CONCLUSIONES

La evidencia en la literatura muestra que el daño al DNA influye en la fertilidad de las parejas. Si el espermatozoide con lesiones en el DNA fertiliza un óvulo y origina un nacimiento, es posible que se produzca una anomalía congénita. Por lo tanto, se debe estudiar el daño al DNA en pacientes infértiles. El estudio del DNA espermático puede ayudar en la selección de espermatozoides con la menor cantidad de daño para su uso en la concepción asistida.

Los resultados del estudio de fragmentación del DNA ayudarían al médico en la evaluación, y proporcionarían mejor consejo a las parejas infértiles en relación con sus posibilidades de lograr una gestación a término y obtener un niño sin alteraciones. Esto puede aliviar los problemas emocionales y sociales asociados con los intentos fallidos en las técnicas de reproducción asistida. Estas técnicas también podrían tener efectos positivos en la disminución de la mortalidad infantil en recién nacidos y en niños menores de 5 años.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oehninger S. Strategies for the infertile man. Semin Reprod Med. 2001;19:231-7.
2. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 1998;69:528-32.
3. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, et al. The use of the two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. Hum Reprod. 2000;15:1112-6.
4. Aitken R, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction. 2001;122:497-506.
5. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Biol Reprod. 1997;56:602-7.
6. Twigg J, Irvine D, Aitken J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1998;13:1864-7.
7. Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. Hum Reprod. 2002;17:1856-62.
8. Carrell D, Liu L, Peterson C, Jones K, Hatasaka H, Erickson L, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. Arch Androl. 2003;49:49-55.
9. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod. 1999;14:1039-49.
10. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. Fertil Steril. 2000;73:43-50.