

FRAGMENTACIÓ DEL DNA ESPERMÀTIC EN PORTADORS DE REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES

Agustín García-Peiró,¹ Maria Oliver-Bonet,¹ Joaquina Navarro,¹ Carlos Abad,² Miriam Guitart,² Maria José Amengual² i Jordi Benet¹

¹Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona.
08193 Bellaterra. jordi.benet@uab.es, agusti.garcia@uab.es.

²Corporació Sanitària Parc Taulí.

Resum

S'ha determinat la fragmentació del DNA espermàtic en portadors de reorganitzacions cromosòmiques ($n = 11$) i s'ha caracteritzat l'evolució de la fragmentació incubant cada mostra a 37 °C durant diferents temps (0, 1, 4, 8 i 24 hores). Els mètodes emprats van ser TUNEL, SCSA i SCDt. A temps 0 h, l'índex de fragmentació del DNA (%DFI) va ser significativament major ($p = 0,025, 0,022$ i $0,014$, respectivament) en el grup dels portadors ($24,18 \pm 9,8, 24,36 \pm 10,8$ i $24,81 \pm 12,60$) que en el grup control ($n = 8$) ($15,12 \pm 3,52, 13,75 \pm 5,80$ i $13,12 \pm 4,42$). Aquests resultats preliminars suggereixen que la fragmentació del DNA s'hauria d'avaluar per determinar l'estat de fertilitat en aquests pacients. L'evolució del dany del DNA podria estar relacionada amb la presència i característiques pròpies de cada tipus de reorganització cromosòmica. Més estudis són necessaris per aclarir les causes responsables d'aquest increment en la fragmentació del DNA espermàtic.

Paraules clau: TUNEL, SCSA, SCDt, reorganitzacions cromosòmiques, fragmentació del DNA.

Abstract

DNA integrity in the sperm has been determined in chromosomal reorganization carriers ($n = 11$) and the evolution of fragmentation in different periods of storage at 37 °C (0, 1, 4, 8 and 24 hours) has also been characterized. Methods used were TUNEL, SCSA and SCDt. At time 0 h, DNA fragmentation index (%DFI) were statistical increased ($p = 0.025, 0.022$ and 0.014 , respectively) in the carriers group ($24.18 \pm 9.8, 24.36 \pm 10.8$) respect to the control group ($n = 8$) ($15.12 \pm 3.52, 13.75 \pm 5.80$ and 13.12 ± 4.42). These preliminary results suggest that DNA fragmentation should be evaluated in reorganization carriers and it should be considered in order to establish fertility status in these patients. DNA damage evolution could be related to the presence and characteristics of each type of chromosome rearrangement. Further investigations should help to elucidate the responsible causes for the increased sperm DNA fragmentation in these patients.

Key words: TUNEL, SCSA, SCDt, chromosomal reorganizations, DNA fragmentation.

INTRODUCCIÓ

Nombrosos estudis posen de manifest que en individus infèrtils és més freqüent trobar espermatozoides amb el DNA fragmentat que no pas en els que són fèrtils (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2002). Establir un valor predictiu de fertilitat mitjançant diferents tècniques en relació als diferents tractaments de reproducció assistida ha esdevingut un objectiu en els últims anys. En aquest sentit, els treballs en relació al valor predictiu d'aquesta variable són sovint contraposats (Lewis i Agbaje, 2008; Lin *et al.*, 2008). Segons una recent metaanàlisi, els valors de fragmentació que es

relacionen amb la infertilitat estarien entre el 30-40 % (Evenson i Wixon, 2008). No obstant això, valors superiors al 20 % podrien indicar una situació anormal (Erenpreiss *et al.*, 2006). Entre els diferents mètodes utilitzats, trobem l'assaig TUNEL (*terminal transferase dUTP nick-end labelling*), el mètode ISNT (*in situ nick translation*), l'assaig SCSA (*sperm chromatin structure assay*), l'assaig Comet i, més recentment, el SCDt (*sperm chromatin dispersion test*). Encara que no existeix uniformitat de criteris sobre les diferents metodologies a l'hora de realitzar l'anàlisi, a causa de la manca de normalització en els protocols i a l'existència de diferents factors que poden influir en el resultat, (Domínguez-Fandos

et al., 2007; Muratori *et al.*, 2008) s'ha trobat, no obstant això, una bona correlació entre el TUNEL, el SCSA i el SCDt (Chohan *et al.*, 2006). Els principals mecanismes implicats en la fragmentació del DNA de l'espermatozoide són l'estrès oxidatiu, alteracions durant la transició histones-protamines i certes formes indeterminades d'apoptosi (Aitken *et al.*, 2009).

A més, l'exposició a contaminació industrial, el tabac, tenir un elevat índex de massa corporal, tenir una edat avançada o determinades infeccions urogenitals, o pertànyer a uns grups determinats de pacients, com ara pacients amb varicocele, criptorquídia, càncer i portadors de reorganitzacions cromosòmiques, pot suposar presentar un increment en el percentatge d'espermatozoides amb el DNA fragmentat (Gosálvez *et al.*, 2008).

En aquest treball s'ha volgut determinar la fragmentació del DNA d'espermatozoides en portadors de reorganitzacions cromosòmiques i comparar els valors obtinguts amb donants fèrtils. Aquest estudi s'ha realitzat amb tres mètodes diferents (TUNEL, SCSA i SCDt), per tal de comprovar si hi ha correlació entre aquestes tres metodologies.

MATERIAL I MÈTODES

S'han analitzat mostres de semen d'un total d'onze portadors de reorganitzacions cromosòmiques (dues inversions i nou translocacions recíproques). El grup control va estar integrat per mostres de vuit homes amb seminograma normal i paternitat recent. Totes les mostres van ser incubades en un bany a 37 °C i la

fragmentació del DNA es va mesurar a temps 0, 1, 4, 8 i 24 hores. El mètode TUNEL es va realitzar fent servir el *kit* de Roche (Ref. 11684795910, Roche Diagnostic, Penzberg, Alemanya). En aquesta tècnica un enzim transferasa incorpora un nucleòsid conjugat amb un compost fluorescent allà on hi ha un extrem 3' a la cadena del DNA, i la fluorescència és detectada amb citometria de flux. El SCSA es va realitzar seguint les indicacions d'Evenson *et al.* (1999). Aquest mètode utilitza un compost metacromàtic, que és el taronja d'acridina (*acridine orange*, AO). Breument, després d'un tractament àcid es tenyeixen els espermatozoides amb l'AO, el colorant s'intercala formant agregats i dona una emissió fluorescent en vermell si tenen el DNA fragmentat, i si no està fragmentat aquesta l'emissió fluorescent és verda. El percentatge vermell/verd ens dona el valor de fragmentació del DNA (%DFI). El SCDt (Halo-sperm Kit; Halotech DNA SL, Madrid; Conception Technologies, San Diego, EUA) es basa en el fet que el DNA de l'espermatozoide no pot formar un halo de dispersió de la cromatina quan té el DNA fragmentat. Breument, la mostra s'inclou en agarosa i es forma un gel sobre un portaobjectes. Tot seguit es fa un tractament de desnaturalització seguit d'una lisi proteica. Es tenyeix amb iodur de propidi (IP) i es quantifica al microscopi el percentatge d'espermatozoides que no mostren aquest halo de dispersió.

Per a l'anàlisi estadística es va fer servir el test de correlació per determinar el grau de concordança entre els diferents mètodes fent comparacions un a un. Les comparacions entre controls i pacients es van realitzar amb el test *t* de Student o *U* de Mann-With-

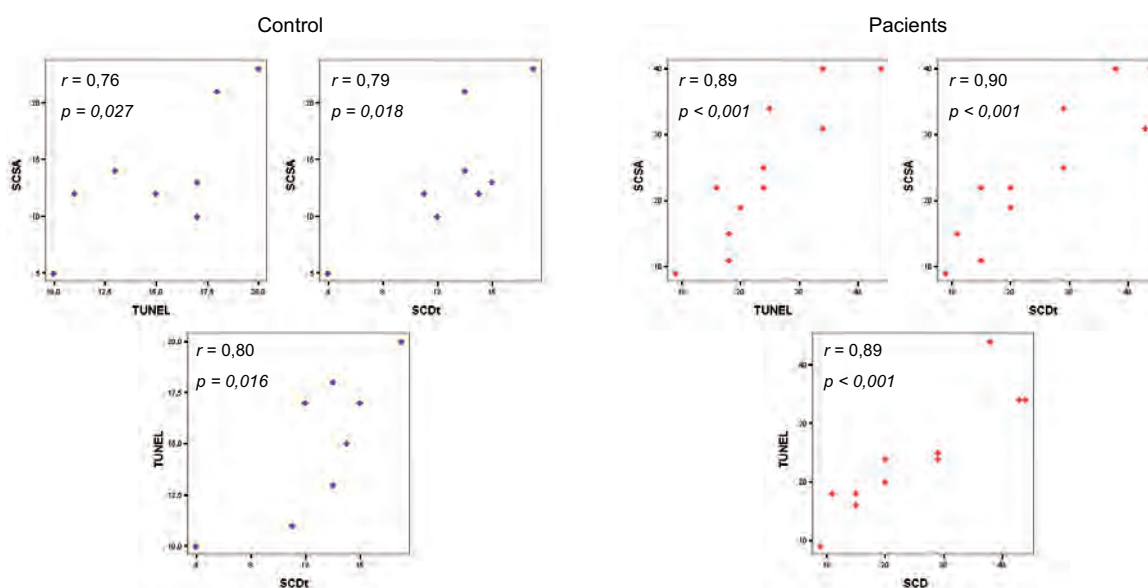


Figura 1. Diagrames de dispersió dels valors de fragmentació del DNA obtinguts amb TUNEL, SCSA i SCDt, en controls i pacients. S'indiquen els corresponents coeficients de correlació (*r*) i els valors de *p*.

Taula 1. Índex de fragmentació del DNA (mitjanes i desviacions típiques) de controls i portadors de reorganitzacions cromosòmiques amb TUNEL, SCSA i SCDt

Mètode	Controls	Portadors	Valors de <i>P</i>
TUNEL	15,12 ± 3,52	24,18 ± 9,88	0,025*
SCSA	13,75 ± 5,80	24,36 ± 10,80	0,022*
SCDt	13,12 ± 4,42	24,81 ± 12,60	0,014*

ney, segons corresponia, amb el programari SPSS 15.0 per a Windows.

RESULTATS

L'anàlisi amb tres mètodes diferents ha permès establir el grau de correlació entre les diferents tècniques utilitzades en aquest estudi. En totes les comparacions vam obtenir valors de $r > 0,75$ (vegeu la figura 1). A temps 0 h, l'índex de fragmentació del DNA va ser significativament major ($p = 0,025$, $0,022$ i $0,014$, respectivament) en el grup dels portadors ($24,18 \pm 9,8$, $24,36 \pm 10,8$ i $24,81 \pm 12,60$) que en el grup control ($n = 8$) ($15,12 \pm 3,52$, $13,75 \pm 5,80$ i $13,12 \pm 4,42$) (vegeu la taula 1 i la figura 2).

Els valors de fragmentació del DNA a diferents temps d'incubació van presentar un increment respecte als valors basals. A temps 0 h, el rang oscil·là del 4 % al 19 % en el grup control, i del 9 % al 44 % en els pacients. A les 4 hores d'incubació el 37 % de les mostres del grup control superava el 30 % de fragmentació davant un 72 % en els pacients. A les 24 hores, dues mostres del grup control presentaven

un valor de la fragmentació del DNA per sota del 30 %. En canvi, cap mostra dels pacients es va mantenir per sota d'aquest valor.

DISCUSSIÓ

S'ha analitzat la fragmentació del DNA amb tres mètodes diferents i s'ha obtingut una bona correlació amb tots tres, tant en els controls fèrtils com amb el grup de portadors. Així doncs, tant el TUNEL com l'SCSA i l'SCDt són mètodes sensibles per detectar dany en el DNA de l'espermatozoide.

La fragmentació del DNA en els diferents grups de mostres analitzades va presentar un increment significatiu respecte al grup control. Aquests valors incrementats reflecteixen un estat d'anormalitat en la integritat del DNA, que podria comprometre la fertilitat d'aquests individus. L'alta variabilitat observada en la fragmentació del DNA, així com les diferències observades en l'increment de la fragmentació per a cada mostra en els portadors de reorganitzacions cromosòmiques, suggereix que l'evolució del dany del DNA podria estar relacionada amb la presència i característiques pròpies de cada tipus de reorganització cromosòmica. Aquests resultats preliminars suggereixen que pot ser d'utilitat determinar la fragmentació del DNA en els portadors de reorganitzacions cromosòmiques amb vista a establir-ne el potencial de fertilitat.

AGRAÏMENTS

Treball realitzat amb l'ajut econòmic del FIS (PI051834 i PI080623) i SGR 0500495.

BIBLIOGRAFIA

- AITKEN, R. J.; DEIULIUS, G. N.; McLACHLAN, R. I. (2009). «Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line». *Int. J. Androl.*, 32(1): 46-56.
- CHOHAN, K. R.; GRIFFIN, J. T.; LAFROMBOISE, M.; JONGE, C. J. DE; CARRELL, D. T. (2006). «Comparis-

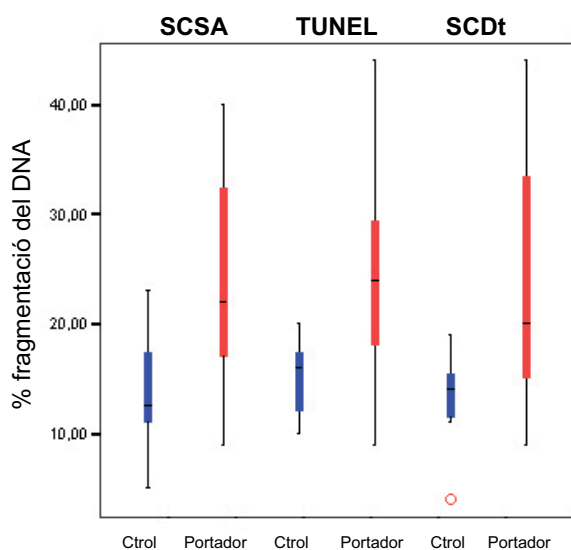


Figura 2. Percentatge de fragmentació del DNA d'espermatozoide en controls fèrtils i portadors de reorganitzacions cromosòmiques determinat per SCSA, TUNEL i SCDt.

- on of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm». *J. Androl.*, 27(1): 53-59.
- DOMÍNGUEZ-FANDOS, D.; CAMEJO, M. I.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2007). «Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy». *Cytometry A.*, 71(12): 1011-1018.
- ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. (2006). «Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects». *Asian J. Androl.*, 8(1): 11-29.
- EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS, P. DE; CLAUSSEN, O. P. (1999). «Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic». *Hum. Reprod.*, 14(4): 1039-1049.
- EVENSON, D. P.; WIXON, R. (2008). «Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. Pregnancy outcome». *Fertil. Steril.*, 90(4): 1229-1231.
- GOSÀLVEZ, J.; CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ, J. L.; NÚÑEZ CALONGE, R. (2008). «Fragmentación del ADN espermático». *Rev. Int. Androl.*, 6(3): 193-209.
- LEWIS, S. E.; AGBAJE, I.; ALVAREZ, J. (2007). «Sperm DNA test as useful adjuncts to semen analysis». *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 54(3): 111-125.
- LIN, M. H.; KUO-KUANG LEE, R.; LI, S. H.; LU, C. H.; SUN, F. J.; HWU, Y. M. (2008). «Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates». *Fertil. Steril.*, 90(2): 352-359.
- MURATORI, M.; FORTI, G.; BALDI, E. (2008). «Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling». *Cytometry A.*, 73(9): 785-787.
- PRACTICE COMMITTEE OF AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE (2008). «The clinical utility of sperm DNA integrity testing». *Fertil. Steril.*, 90(5, suppl.): S178-180.