Biologia de la reproducció
Vol. 16, p. 47-52 (2019)

EFECTIVITAT DE LES TÈCNIQUES DE SELECCIÓ ESPERMÀTICA EN PACIENTS AMB FRAGMENTACIÓ DE L'ADN ESPERMÀTIC ALTERADA

Silvia García-Monclús[1], Marta Ballester[1], Sandra García[1], Natàlia Chávez[1], Montserrat Boada[1], Álvaro Vives[1,2], Buenaventura Coroleu[1], Anna Veiga[1,3]

[1] Dexeus Mujer, Hospital Universitari Dexeus, Barcelona. (silgar@dexeus.com)

[2] Fundació Puigvert, Barcelona.

[3] Banc de línies cel·lulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona, Barcelona.

Resum

La correlació entre la fragmentació de l'ADN espermàtic i l'èxit de les tècniques de reproducció assistida (TRA) ha portat al desenvolupament de diferents metodologies per seleccionar poblacions d'espermatozoides lliures d'aquesta fragmentació. En aquest treball s'ha comparat retrospectivament el resultat de 137 cicles d'ICSI amb espermatozoides seleccionats mitjançant la tècnica clàssica de gradients de densitat (GD) respecte MACS (Magnetic-activated cell sorting) o xip FERTILE® en un grup de pacients amb fragmentació de l'ADN espermàtic elevada. No s'han observat diferències significatives en relació a la taxa de fecundació, embrions evolutius, ni embaràs clínic entre els diferents grups. Tot i que els grups eren comparables en quant a edat de la dona, índex de massa corporal (IMC) de la dona, hormona antimulleriana (AMH), recompte fol·licular antral (RFA) i edat de l'home, calen estudis prospectius aleatoritzats que demostrin si existeix un benefici clínic en l'aplicació d'aquestes tècniques de selecció espermàtica.

Paraules clau: fragmentació ADN espermàtic, MACS, xip FERTILE®.

Abstract

The correlation between sperm DNA fragmentation and the output of assisted reproduction techniques led to the development of several techniques aimed to select sperm populations without DNA fragmentation. In this work we compared retrospectively the outcome of 137 ICSI cycles with density gradients, MACS (Magnetic-activated cell sorting) or chip FERTILE® selected spermatozoa. No significant differences were observed regarding fertilization rate, evolutionary embryo rate or clinical pregnancy rate between the different groups. Although groups were comparable in terms of women's age, women's body mass index, anti-mullerian hormone, antral follicular count and man's age, randomized prospective studies are required to demonstrate if there is a clinical benefit in the application of these techniques.

Key words: sperm DNA fragmentation, MACS, chip FERTILE®.

INTRODUCCIÓ

L'anàlisi dels paràmetres seminals tradicionals ofereix una informació limitada pel que fa al diagnòstic i al pronòstic dels pacients amb problemes de fertilitat. Alguns homes amb valors seminals dins dels rangs de referència poden presentar problemes de fertilitat. Tanmateix, hi ha homes fèrtils que poden tenir un seminograma alterat (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2015).

Més enllà dels paràmetres seminals convencionals, en els darrers anys la fragmentació de l'ADN espermàtic ha esdevingut una nova eina diagnòstica per pacients amb infertilitat. Diversos estudis han demostrat que els homes infèrtils presenten nivells de fragmentació de l'ADN espermàtic més elevats que els individus fèrtils (Barratt et al. 2010; Venkatesh et al. 2011). Aquesta fragmentació pot afectar tant a la probabilitat d'embaràs natural (Spanò et al. 2000) com a l'èxit de les tècniques de reproducció assistida (TRA) (Larson et al. 2000; Bungum et al. 2007; Meseguer et al. 2011). A més, alguns estudis han descrit una correlació inversa entre la fragmentació i la concentració d'espermatozoides, la mobilitat i la morfologia espermàtica (Venkatesh et al. 2011).

La fragmentació de l'ADN espermàtic es pot produir per diferents mecanismes com una expressió anòmala de protamines, la presència d'espècies reactives d'oxigen o una apoptosi incompleta durant l'espermatogènesi (Sawyer et al. 2003; Barratt et al. 2010). D'al-

tra banda, aquesta fragmentació està relacionada amb la presència de varicocele, criptorquídia, l'edat, el tabac o l'exposició a tòxics, entre d'altres (Schmid et al. 2007; Barratt et al. 2010; Ribas-Maynou et al. 2012). La correlació entre la integritat de l'ADN espermàtic i l'èxit de les TRA ha portat al desenvolupament de diferents metodologies per avaluar els nivells fragmentació. Entre les tècniques més utilitzades es troben SCSA (sperm chromatin structure assay), TUNEL (deoxynucleotidyltransferase- mediated Dutp nick end labeling assay), SCD (sperm chromatin dispersion test) i COMET (single-cell gel electrophoresis assay), essent aquesta última l'única que permet diferenciar entre trencaments de cadena senzilla o cadena doble (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2013).

Donat que la integritat de l'ADN és essencial pel correcte desenvolupament embrionari, en els darrers anys s'han intentat desenvolupar tècniques de selecció espermàtica que permetin als embriòlegs seleccionar els millors espermatozoides no només en quant a mobilitat i morfologia sinó també en relació a la fragmentació de l'ADN espermàtic. Més enllà de la part diagnòstica, també es necessiten tècniques de selecció espermàtica que millorin els resultats d'aquests pacients en el context de les TRA.

Entre les metodologies desenvolupades destaquen l'ús de MACS (Magnetic-activated cell sorting) i del xip FERTILE®. El sistema MACS es basa en l'eliminació dels espermatozoides apoptòtics que han externalitzat la fosfatidilserina mitjançant un sistema de columnes d'annexina V. Diversos estudis han demostrat l'efectivitat de MACS en millorar la qualitat embrionària i les taxes d'embaràs respecte a la selecció espermàtica mitjançant gradients de densitat o *swim-up* (Dirican et al. 2008; Gil et al. 2013; Ziarati et al. 2018). A més, s'ha reportat que l'ús de MACS no incrementa els riscos obstètrics ni perinatals (Romany et al. 2017). No obstant, no s'ha observat un benefici de la utilització de MACS en cicles de recepció d'oòcits (Romany et al. 2014).

D'altra banda, el xip FERTILE® es basa en un sistema de microfluids que mimetitzen l'ambient que troba l'espermatozoide al tracte genital femení, essent així una aproximació més fisiològica per la selecció espermàtica (Suarez & Wu 2016; Chinnasamy et al. 2017). En l'únic estudi publicat fins a la data amb resultats clínics, els autors no observen diferències significatives en la taxa d'embaràs ni nascut viu a l'aplicar de forma aleatòria la tècnica de *swim-up* o xip FERTILE® en parelles amb infertilitat idiopàtica (Yetkinel et al. 2019). Malgrat tot, cap d'aquests estudis s'ha centrat en pacients amb fragmentació de l'ADN espermàtic alterada.

L'objectiu d'aquest treball és analitzar retrospectivament el resultat de cicles d'ICSI en un grup de pacients amb fragmentació de l'ADN espermàtic elevada amb espermatozoides seleccionats mitjançant GD (gradients de densitat), MACS o xip FERTILE®.

MATERIALS I MÈTODES

Inclusió de pacients

Es van analitzar retrospectivament 137 cicles de FIV, DGP (diagnòstic genètic preimplantacional) i recepció d'oòcits realitzats al nostre centre entre juny de 2017 i març de 2019. Tots els pacients inclosos a l'estudi havien estat diagnosticats amb nivells de fragmentació de l'ADN espermàtic elevada mitjançant SCD, COMET, TUNEL o SCSA. Es va utilitzar indistintament la tècnica de GD (n=38), MACS (n=25) o xip FERTILE® (n=74) per la selecció espermàtica. En tots els casos es va utilitzar la tècnica d'ICSI per inseminar els oòcits.

Criteris d'exclusió

Cicles de inseminació intrauterina o FIV convencional.

Valoració seminal

Les mostres de semen es van obtenir per masturbació i es van recollir en un pot estèril. Després de la liqüefacció de les mostres a temperatura ambient, es va valorar la mobilitat i concentració d'espermatozoides emprant la càmera Makler (Sefi Medical) i el sistema CASA SCA® (Microptics).

Tècnica de GD

Per la selecció espermàtica es va preparar la mostra mitjançant gradients discontinus de densitat de PureSperm 40 % i 80 % (Nidacon) que es van centrifugar a 1200 rpm. A continuació es va rentar la fracció recuperada amb medi d'inseminació G-IVF™ PLUS (Vitrolife).

Tècnica de MACS: Selecció espermàtica per columnes d'annexina V

Per la selecció espermàtica es va preparar la mostra mitjançant gradients discontinus de densitat de PureSperm 40 % i 80 % (Nidacon) que es van centrifugar a 1200 rpm. Seguidament, es van utilitzar els reactius del kit MACS® ART Annexin V System (Miltenyi Biotec) seguint les instruccions de la casa comercial. Breument, els espermatozoides recuperats dels gradients es van rentar i el pellet obtingut es va incubar amb el reactiu

annexina V 15 min a temperatura ambient. La suspensió es va carregar en columnes de separació col·locades sobre un imant. La fracció no apoptòtica es va recuperar per a dur a terme ICSI mentre que els espermatozoides apoptòtics marcats magnèticament van quedar retinguts a la columna.

Tècnica de xip FERTILE®: Selecció espermàtica per microfluids

Per la selecció espermàtica es va utilitzar el dispositiu xip FERTILE® (CIMAB IBERICA). Cada canal del dispositiu es va omplir afegint 6,5 µl de medi d'inseminació G-IVF™ PLUS (Vitrolife) al port d'entrada i 6,5 µl de medi al port de sortida. Es van afegir 2 µl de l'ejaculat al port d'entrada i es van recobrir tots els ports d'entrada i sortida amb oli mineral. Es va deixar el xip a un incubador 30 min a 37 ºC i posteriorment es van recuperar els espermatozoides seleccionats del port de sortida.

ICSI i cultiu embrionari

Tots els oòcits es van inseminar mitjançant ICSI 40 h després de l'administració de hCG. A continuació es van cultivar en incubadors amb tecnologia time-lapse i es va avaluar la qualitat embrionària seguint els criteris de valoració morfològica d'ASEBIR. Es van transferir 1-2 embrions en dia 3 o dia 5 seleccionant sempre aquells de millor qualitat. Els embrions supernumeraris es van vitrificar emprant Cryotop® de Kitazato i medis de vitrificació de la mateixa casa comercial. En el cas de cicles diferits, no embaràs o avortament de la transferència en fresc, es van realitzar criotransferències d'1-2 embrions en dia 3 o 5 de desenvolupament.

Anàlisi estadística

L'objectiu principal d'aquest estudi retrospectiu era descriure els resultats obtinguts en cicles de FIV/ICSI amb espermatozoides seleccionats mitjançant GD, MACS o xip FERTILE® en un grup de pacients amb fragmentació de l'ADN espermàtic elevada. Es va considerar embaràs clínic la presència d'un embrió amb batec cardíac detectable per ecografia. Les característiques demogràfiques dels pacients entre els diferents grups es van comparar mitjançant la prova ANOVA. Per valorar si les taxes de fecundació i embrions evolutius eren comparables entre grups es va calcular el percentatge amb els intervals de confiança al 95 %. La proporció de cicles sense embrions evolutius i les taxes d'embaràs es van comparar mitjançant la prova khi-quadrat (X^2).

RESULTATS

En aquest estudi retrospectiu es van incloure un total de 137 cicles de FIV, DGP o recepció amb factor masculí de fragmentació d'ADN espermàtic alterada. Dins del grup de GD (n=38) hi havia 18 cicles de FIV, 10 cicles de DGP i 10 cicles de recepció d'oòcits. Dins del grup MACS (n=25) hi havia 6 cicles de FIV, 10 cicles de DGP i 9 cicles de recepció d'oòcits. Dins del grup xip FERTILE® (n=74) hi havia 26 cicles de FIV, 25 cicles de DGP i 23 cicles de recepció d'oòcits.

Pel que fa a les característiques dels grups GD, MACS i xip FERTILE® no es van observar diferències significatives en relació a l'edat de la dona, índex de massa corporal (IMC) de la dona, hormona antimulleriana (AMH), recompte de fol·licles antrals (RFA) ni edat de l'home (taula 1).

Les taxes de fecundació dels grups GD, MACS i xip FERTILE® van ser 70,5 %, 68,3 % i 63,3% respectivament. Les taxes d'embrions evolutius van ser 49,8 %, 60,5 % i 53,0 % respectivament. No es van observar diferències significatives en aquestes taxes (taula 2). Addicionalment, també es va calcular el percentatge de cicles on no es va obtenir cap embrió evolutiu, que va ser un 13,2 % en el grup GD, 4,0 % en el grup MACS i 13,5 % en el grup xip FERTILE®. Les diferències entre grups no van ser significatives (p-valor 0,417). Pel que

Taula 1: característiques demogràfiques dels pacients.

	GD (n=38)	MACS (n=25)	Xip FERTILE® (n=74)	p-valor
Edat dona (promig, desvest)	38,05±4,03	39,24±4,89	38,77±3,87	0,504
IMC dona (promig, desvest)	21,76±4,98	22,96±4,65	22,39±3,53	0,612
AMH (promig, desvest)	2,60±2,54	1,50±1,10	3,05±3,33	0,487
RFA (promig, desvest)	13,30±7,49	12,67±10,01	14,20±9,64	0,811
Edat home (promig, desvest)	39,66±4,25	41,16±7,01	40,35±5,37	0.565

fa a les taxes d'embaràs clínic tampoc es van trobar diferències significatives. La taxa d'embaràs clínic per cicle iniciat dels grups GD, MACS i xip FERTILE® va ser 44,7 %, 56,0 % i 44,6 % respectivament (p-valor 0,589). Valorant només els cicles on es va obtenir algun embrió evolutiu, les taxes d'embaràs clínic van ser 51,5 %, 58,3 % i 51,6 % respectivament (p-valor 0,837) (taula 2).

Taula 2: resultats dels cicles d'ICSI en pacients amb fragmentació de l'ADN espermàtic alterada.

	GD (n=38)	MACS (n=25)	Xip FERTILE® (n=74)	p-valor
Embrions fecundats/ inseminats (%, IC 95%)	70,5 (0,632-0,778)	68,3 (0,602-0,763)	63,3 (0,570-0,696)	NS
Embrions evolutius/ fecundats (%, IC 95%)	49,8 (0,394-0,602)	60,5 (0,512-0,697)	53,0 (0,467-0,592)	NS
Cicles sense embrions evolutius (%)	13,2 (5/38)	4,0 (1/25)	13,5 (10/74)	0,417
Taxa embaràs clínic/cicle (%)	44,7 (17/38)	56,0 (14/25)	44,6 (33/74)	0,589
Taxa embaràs clínic/ cicle evolutiu (%)	51,5 (17/33)	58,3 (14/24)	51,6 (33/64)	0,837

DISCUSSIÓ

Diversos estudis han relacionat la fragmentació de l'ADN espermàtic amb la taxa de fecundació, embaràs, avortament o la qualitat embrionària en cicles de FIV/ ICSI (Robinson et al. 2012; Ribas-Maynou et al. 2013; Simon et al. 2014). No obstant, cada tècnica presenta un punt de tall diferent i no existeix consens a la bibliografia sobre quina té un poder predictiu superior (Ribas-Maynou et al. 2013; Simon et al. 2014). Tampoc existeix consens sobre quines tècniques de selecció espermàtica aplicar per aquest grup de pacients.

En aquest treball retrospectiu s'han analitzat 137 cicles de pacients amb fragmentació de l'ADN espermàtic alterada. No s'han observat diferències significatives en les taxes de fecundació, evolució embrionària ni embaràs clínic al processar la mostra mitjançant GD, MACS o xip FERTILE®. Malgrat està descrit a la bibliografia que les tècniques de selecció espermàtica MACS i xip FERTILE® contribueixen a disminuir la fragmentació de l'ADN, cap estudi prospectiu aleatoritzat centrat en aquest perfil de pacients ha demostrat encara un benefici clínic. En aquesta línia, en aquest treball retrospectiu, amb un número de casos limitat, no s'ha pogut demostrar un benefici en l'aplicació d'aquestes tècniques. Malgrat tot, per completar l'estudi caldrà esperar a que tots els pacients realitzin totes les transferències embrionàries possibles i valorar les taxes d'avortament i de nascut viu en un futur. En relació al xip FERTILE®, recentment s'ha publicat el primer estudi prospectiu aleatoritzat en parelles amb infertilitat idiopàtica. Malgrat que l'aplicació del xip va produir un increment en la qualitat embrionària, no s'han observat diferències significatives en la taxa d'embaràs ni nascut viu respecte *swim-up* (Yetkinel et al. 2019).

Està descrit que a banda d'un resultat de fragmentació patològic, també és important l'abast d'aquesta fragmentació. S'ha observat que un increment del 10% en la fragmentació mitjançant la tècnica SCD incrementa la probabilitat de no aconseguir embaràs en 1.31 (Meseguer et al. 2011). En el nostre treball, donat que el diagnòstic de fragmentació es va realitzar mitjançant diferents tècniques, cadascuna amb el seu punt de tall, no s'ha pogut comprovar que els nivells de fragmentació siguin comparables entre grups ni estudiar si existeix aquesta correlació. A més, tampoc s'ha pogut diferenciar entre trencaments de cadena senzilla o doble.

També és important tenir en compte que l'oòcit juga un paper fonamental en la reparació d'aquesta fragmentació i de fet en cicles de donació d'òvuls no s'ha observat correlació entre taxes d'embaràs i fragmentació ni un benefici en l'aplicació de MACS (Meseguer et al. 2011; Romany et al. 2014). En aquest treball, donat el número limitat de casos, no s'ha pogut valorar si existien diferències entre els cicles realitzats amb oòcits propis o de donants.

Tenint en compte el poder limitat d'aquest estudi retrospectiu i la manca d'evidència científica focalitzada en pacients amb fragmentació alterada, considerem indispensable la realització d'estudis prospectius aleatoritzats per comprovar si aquestes tècniques de selecció espermàtica poden incrementar l'èxit de les TRA en aquests grup de pacients.

REFERÈNCIES

BARRATT, C.L.R. et al., 2010. Sperm DNA: Organization, protection and vulnerability: From basic science to clinical applications-a position report. *Human Reproduction*, 25(4), pp.824–838.

BUNGUM, M. et al., 2007. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction*, 22(1), pp.174–179.

CHINNASAMY, T. et al., 2017. Guidance and Self-Sorting of Active Swimmers: 3D Periodic Arrays Increase Persistence Length of Human Sperm Selecting for the Fittest. *Advanced Science*, 5(2).

DIRICAN, E.K. et al., 2008. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(8), pp.375–381.

GIL, M. et al., 2013. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(4), pp.479–85.

LARSON, K.L. et al., 2000. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human reproduction*, 15(8), pp.1717–22.

MESEGUER, M. et al., 2011. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility*, 95(1), pp.124–128.

RIBAS-MAYNOU, J. et al., 2012. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Human Reproduction*, 27(3), pp.652–658.

Ribas-Maynou, J. et al., 2013. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*, 1(5), pp.715–722.

ROBINSON, L. et al., 2012. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 27(10), pp.2908–2917.

ROMANY, L. et al., 2017. Obstetric and perinatal outcome of babies born from sperm selected by MACS from a randomized controlled trial. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(2), pp.201–207.

ROMANY, L. et al., 2014. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertility and sterility*, 102(6), p.1567–75.e1.

SAWYER, D.E. et al., 2003. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 529(1–2), pp.21–34.

SCHMID, T.E. et al., 2007. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Human Reproduction*, 22(1), pp.180–187.

SIMON, L. et al., 2014. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Human Reproduction*, 29(5), pp.904–917.

SPANÒ, M. et al., 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertility and sterility*, 73(1), pp.43–50.

SUAREZ, S.S. & Wu, M., 2016. Microfluidic devices for the study of sperm migration. *Molecular Human Reproduction*, 23(4), pp.227–234.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2015. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 103(3), pp.e18-25.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2013. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertility and Sterility*, 99(3), pp.673–677.

VENKATESH, S. et al., 2011. Clinical Significance of Sperm DNA Damage Threshold Value in the Assessment of Male Infertility. *Reproductive Sciences*, 18(10), pp.1005–1013.

YETKINEL, S. et al., 2019. Effects of the microfluidic chip technique in sperm selection for intracytoplasmic sperm injection for unexplained infertility: a prospective, randomized controlled trial. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(3), pp.403–409.

ZIARATI, N. et al., 2018. Clinical outcomes of magnetic activated sperm sorting in infertile men candidate for ICSI. *Human Fertility*, pp.1–8.