

MÚLTIPLE CARACTERITZACIÓ DE LA FRAGMENTACIÓ DE L'ADN ESPERMÀTIC DE CADENA SENZILLA I DOBLE EN ESPERMATOZOIDES SELECCIONATS PER A ICSI

Sandra Lara Cerrillo¹, Maria Gracia Catalá², Jordi Benet Català³, Jordi Ribas Maynou¹, Agustín García Peiró¹

¹Centre d'Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona (CIMAB), Edifici Eureka, PBM5, Parc de Recerca de la UAB (PRUAB), Bellaterra, Spain.

²Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

³Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

08193 Bellaterra. info@cimab.es

Resum

En l'avaluació de la infertilitat, l'estudi de la fragmentació de l'ADN espermàtic s'ha establert com un sistema rellevant per al diagnòstic del baró. La injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI) és sovint el tractament de reproducció assistida d'elecció, però estudis recents mostren que l'anàlisi de la fragmentació en ejaculat analitzada amb els mètodes TUNEL i SCD no es correspon amb resultats clínics en cicles d'ICSI. El present estudi té com a objectiu la comparació de la fragmentació de l'ADN espermàtic entre espermatozoides d'ejaculat i espermatozoides seleccionats per micromanipulació sota els criteris de morfologia i motilitat que s'apliquen en ICSI. Els resultats mostren que la fragmentació extensiva, majoritàriament de cadena senzilla, detectada amb Comet alcalí, SCD i TUNEL disminueix en espermatozoides seleccionats respecte la mostra d'ejaculat i el swim-up ($p < 0.05$). En canvi, la fragmentació localitzada de cadena doble, que només pot ser detectada amb Comet neutre, no presenta aquesta variació ($p = 0.833$). Els resultats obtinguts en aquest estudi preliminar poden ser explicatius del biaix que existeix en la selecció dels espermatozoides en cicles de ICSI, suportant la hipòtesi de que el tipus de dany a l'ADN predominant en aquesta subpoblació d'espermatozoides és de cadena doble i no de cadena senzilla.

Paraules clau: Infertilitat masculina, injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI), fragmentació de l'ADN espermàtic (SDF).

Abstract

Sperm DNA fragmentation analysis has become a relevant system to evaluate male infertility. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is usually the elected treatment in assisted reproduction even recent studies show that sperm DNA fragmentation values analyzed with TUNEL and SCD are not related to clinical outcomes in ICSI cycles. The main purpose of the present study was to compare sperm DNA fragmentation between ejaculated sperm and selected sperm using ICSI motility and morphology criteria. Results show that extensive DNA fragmentation, mainly single-strand breaks and detected with alkaline Comet, SCD and TUNEL assays, is decreased in selected sperm compared to ejaculated sperm or swim-up samples ($p < 0.05$). On the contrary, localized double-strand breaks detected using neutral Comet assay do not show this variation ($p = 0.833$). Results of this preliminary study may be explicative of the bias caused by the selection of sperm cells in ICSI procedures, showing that double-strand breaks are the main DNA damage in this sperm subpopulation.

Key words: male infertility, Intracytoplasmic sperm injection (ICSI), sperm DNA fragmentation (SDF).

INTRODUCCIÓ

La infertilitat és una malaltia comú que actualment afecta el 15% de les parelles en edat reproductiva (Jungwirth et al., 2012). Els tractaments de reproducció assistida po-

den aportar solucions a parelles que no aconsegueixen concebre de forma natural, essent la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI) el procediment més utilitzat tant a nivell estatal (89.4%) (Registro Nacional de Actividad, 2014) com europeu (48.83%) (Calhaz-

Jorge *et al.*, 2016). Tot i això, existeix un elevat nombre de casos en els que el tractament no resulta en un embaràs clínic i el posterior naixement d'un nadó, oscil·lant les taxes de gestació i part sobre el 36.6% i 16.8%, respectivament (Registro Nacional de Actividad, 2014).

L'origen multifactorial de la infertilitat, on els factors masculins i femenins estan implicats en similar proporció, fa difícil saber la causa de les baixes taxes d'èxit en cicles d'ICSI. En relació a la part masculina, existeix un biaix entre els espermatozoides de l'ejaculat i els espermatozoides que finalment són utilitzats per a fecundar i que presenten una millor morfologia i motilitat. Diversos estudis proposen aquest biaix com a possible causant de la falta de capacitat predictiva de les tècniques d'anàlisi en ejaculat sobre l'èxit o fracàs dels cicles d'ICSI (Bach *et al.*, 2016; Lewis *et al.*, 2013).

D'entre les causes genètiques relacionades amb la infertilitat masculina, la fragmentació de l'ADN espermàtic ha estat, en els últims temps, un bon marcador diagnòstic per a l'embaràs de forma natural. Les tècniques més avançades permeten distingir dos tipus de dany a l'ADN espermàtic: de cadena senzilla (ssSDF) i de cadena doble (dsSDF).

La ssSDF es caracteritza per ser un dany extensiu que afecta a totes les regions del genoma (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a), causada majoritàriament per estrès oxidatiu (Aitken *et al.*, 2013) i relacionada amb la motilitat espermàtica (Sheikh *et al.*, 2008; Simon i Lewis, 2011). El seu efecte clínic recau en la capacitat de fertilització de l'espermatozoide i la consecució d'un embaràs natural (Ribas-Maynou *et al.* 2013). L'avaluació d'aquest dany es pot fer mitjançant les tècniques Comet alcalí, Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) o el Sperm Chromatin Dispersion (SCD). La dsSDF, mesurada únicament amb Comet neutre (Ribas-Maynou *et al.*, 2013), es caracteritza per la seva localització a les regions d'unió a la matriu nuclear i s'ha relacionat amb avortaments de repetició en el primer trimestre de gestació en parelles sense un factor femení aparent (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b), amb alteracions en la cinètica embrionària i amb fallades d'implantació en cicles de ICSI (Casnovas *et al.*, dades no publicades).

Davant la impossibilitat actual d'estudiar l'estat genètic del mateix espermatozoide que serà injectat dins l'òcit, la millor aproximació resulta d'estudiar el subgrup espermatozoides que s'utilitzen en cicles de reproducció assistida. Així, diversos estudis han relacionat una menor fragmentació de l'ADN analitzada amb TUNEL (Franco *et al.*, 2008; Hammoud *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2011) o Comet (Pastuszek *et al.*, 2017) amb l'absència de vacuoles detectades mitjançant la selecció d'espermatozoides seleccionats amb elevada magnificació (MSOME).

En el present estudi es pretén avaluar el risc genètic majoritari en la subpoblació d'espermatozoides seleccionats seguint criteris d'ICSI utilitzant quatre tècniques de detecció de la fragmentació de l'ADN (Comet neutre, Comet alcalí, SCD i TUNEL).

MATERIAL I MÈTODES

Població d'estudi i criopreservació de les mostres

Per al present estudi preliminar s'han inclòs 10 pacients infèrtils amb una mitjana d'edat de 34.10 ± 4.28 anys que han acudit a la consulta de CIMAB. Les mostres d'ejaculat van ser recollides després de 2-3 dies d'abstinència sexual, es van deixar liquar a temperatura ambient i van ser criopreservades. La criopreservació es va dur a terme amb Test Yolk buffer (1:1), aplicant un escalfatge de temperatures: 10 minuts a 4°C; 20 minuts a -80°C i finalment emmagatzemades en N₂ líquid fins el seu ús. La descongelació es va realitzar durant 1 minut a 37°C i posterior dilució del crio-protector en medi F-10 HAM (Sigma-Aldrich, USA). L'estudi ha estat aprovat pel comitè d'ètica de la Corporació Sanitària Parc Taulí. Tots els participants han signat el consentiment informat per a l'ús de les mostres en investigació.

Preparació de les mostres

Les mostres descongelades es van centrifugar a 300g durant 3 minuts per eliminar el medi de criopreservació i es van resuspendre en medi F-10 HAM a 37°C. El swim-up es va realitzar a 37°C durant 30 minuts. Es van recollir 100 µL de la part superior del swim-up i 1 µL es va incorporar en una gota de 5 µL de PVP 10% (Origio, Denmark), submergida en oli mineral (Sigma-Aldrich, USA). La selecció d'espermatozoides es va fer utilitzant un microscopi invertit Nikon Diaphot (Nikon, Japó) tenint en compte criteris d'ICSI de morfologia i motilitat. Es van seleccionar un total de 1212 espermatozoides per al seu anàlisi amb quatre tècniques d'avaluació de la integritat de l'ADN. La fixació dels espermatozoides va diferir en funció de la tècnica utilitzada: per a l'anàlisi TUNEL, es van col·locar entre 10-20 espermatozoides per mostra i experiment en una gota de 1 µL d'aigua mil·liQ, deixant-la assecar a temperatura ambient. Els portaobjectes es van fixar en Carnoy (àcid acètic i metanol, 1:3) *overnight* i es van deixar assecar a temperatura ambient. Per als anàlisis Comet neutre, Comet alcalí i SCD, 1 µL d'agarosa de baix punt de fusió a 37°C (Sigma-Aldrich, USA) es va posar sobre un portaobjectes escalfat prèviament a 37°C. Dins la gota es van col·locar entre 10-20 espermatozoides per mostra i experiment, deixant gelificar l'agarosa durant 5 minuts a temperatura

ambient. La mostra d'ejaculat i el swim-up de cada pacient es van ajustar a una concentració de 1×10^6 espermatozoides /mL i es van tractar de la mateixa forma que els espermatozoides seleccionats segons la tècnica.

Avaluació de la fragmentació de l'ADN

TUNEL

Es va utilitzar el kit *In Situ Cell Death Detection Fluorescein* (Roche, Germany). Seguint les indicacions del fabricant es va preparar un mix amb la solució de *labelling* i l'enzim (9:1) i es van col·locar 5µL sobre cada mostra. La reacció es va dur a terme durant 1h a 37°C i es van realitzar 3 rentats en PBS de 10 minuts cadascun. Es van incloure els controls negatiu (sense enzim) i positiu (mostra d'ejaculat incubada 30 minuts a 37°C amb nucleasa 2000U/µL (deoxyribonuclease I from bovine pancreas; Sigma-Aldrich, Germany).

Comet alcalí i neutre

Seguint el protocol descrit per Ribas-Maynou, 2012b, es van submergir els portaobjectes en dues solucions de lisi consecutives i en solució TBE. Per al Comet alcalí, es va fer una incubació en solució desnaturalitzant a 4°C i l'electroforesi es va dur a terme en un buffer alcalí a 20V durant 4 minuts. Pel Comet neutre, es va fer una electroforesi en buffer TBE a 20V durant 12,5 minuts i un rentat en solució NaCl. En ambdós casos es va fer una incubació en solució de neutralització de pH 7,5 i es va deshidratar en una sèrie d'etanols (70%, 90% i 100%).

Assaig SCD

Es va seguir el protocol descrit en el kit Halosperm (Halotech DNA, Espanya). Breument, es va submergir el portaobjectes en solució desnaturalitzant i es va fer un tractament de lisi. Es va realitzar un rentat amb aigua destil·lada i es va deshidratar en una sèrie d'etanols (70%, 90% i 100%).

Anàlisi microscòpic

Totes les mostres es van avaluar al microscopi de fluorescència Eclipse E200 (Nikon Instruments Europe BV, Netherlands). Es va utilitzar com a tinció fluorescent el DAPI SlowFade Gold Antifade reagent (Life Technologies, USA).

Anàlisi estadística

La normalitat de les variables es va avaluar amb el test Saphiro-Wilk. El test Wilcoxon per a mostres relacio-

nades es va utilitzar per comparar la fragmentació entre grups d'estudi. Tots els tests es van considerar significatius amb un 95% d'interval de confiança.

RESULTATS

Eficiència i comparació de les tècniques

Per a la fixació dels espermatozoides seleccionats amb micromanipulador seguint criteris d'ICSI s'han posat a punt dos protocols diferents: fixació amb Carnoy per a l'assaig TUNEL i fixació en agarosa per a les tècniques Comet neutre, Comet alcalí i SCD. En tots els casos es va obtenir un percentatge de recuperació dels espermatozoides seleccionats superior al 94% (Taula 1). La detecció de la fragmentació de l'ADN amb quatre tècniques diferents ha permès l'anàlisi d'un total de 933 dels 1212 espermatozoides seleccionats, el que representa un 77% d'eficiència mitjana de les quatre tècniques, essent el TUNEL la tècnica amb una millor eficiència d'anàlisi (Taula 1).

A la Figura 1 es pot observar el resultat de l'anàlisi de la fragmentació amb les quatre tècniques emprades per a una mostra d'ejaculat i espermatozoides seleccionats.

Fragmentació de cadena senzilla i doble de l'ADN espermàtic

A la Taula 1 i Figura 2 es mostren els resultats de ssSDF i dsSDF mesurada amb quatre metodologies d'anàlisi en els diferents subgrups d'espermatozoides (ejaculat, swim-up i espermatozoides seleccionats).

L'anàlisi de la dsSDF mitjançant Comet neutre no mostra diferències significatives entre la mostra d'ejaculat, el swim-up i els espermatozoides seleccionats ($p > 0,05$) (Figura 2). En canvi, l'anàlisi de la ssSDF mitjançant Comet alcalí mostra una reducció significativa en els espermatozoides seleccionats respecte la mostra d'ejaculat ($p = 0,043$) i el swim-up ($p = 0,043$) (Figura 2). En la mateixa línia, mitjançant el test SCD s'observa una disminució del dany en els espermatozoides seleccionats respecte la mostra d'ejaculat ($p = 0,043$) i respecte el swim-up ($p = 0,043$) (Figura 2). L'anàlisi mitjançant TUNEL també evidencia que la reducció del dany a l'ADN és significativa entre els espermatozoides seleccionats i la mostra d'ejaculat ($p = 0,008$) i swim-up ($p = 0,012$) (Figura 2).

DISCUSSIÓ

Diferents estudis mostren que mentre en cèl·lules somàtiques la inducció de trencaments en l'ADN genera una

Taula 1. Valors de fragmentació de l'ADN espermàtic (SDF) analitzada amb quatre tècniques (Comet neutre, Comet alcalí, SCD i TUNEL) en mostra d'ejaculat, mostra després del swim-up i espermatozoides seleccionats sota criteris d'ICSI (ICSI). L'eficiència de recuperació (%) representa el nombre d'espermatozoides recuperats respecte els seleccionats. L'eficiència d'anàlisi (%) representa el nombre d'espermatozoides que s'han pogut analitzar respecte els recuperats. Els resultats indiquen mitjana $\pm$ desviació estàndard.

Tècnica	Nº pacients analitzats	Eficiència recuperació	Eficiència d'anàlisi	Nº esperm. analitzats	SDF (%)		
					Ejaculat	Swim-up	ICSI
Comet Neutre	5	98 %	77 %	193	65,5 $\pm$ 6,9	63,3 $\pm$ 6,4	66,3 $\pm$ 19,2
Comet Alcalí	5	98 %	73 %	191	39,8 $\pm$ 9,5	32 $\pm$ 7,4 ^a	13,6 $\pm$ 8,9 ^{a,b}
SCD	6	97 %	73 %	204	20,7 $\pm$ 10,6	13,5 $\pm$ 7 ^a	2,4 $\pm$ 3,3 ^{a,b}
TUNEL	9	94 %	100 %	345	18,5 $\pm$ 10,6	13,2 $\pm$ 7 ^a	0,9 $\pm$ 1,5 ^{a,b}

^a Diferències significatives respecte la mostra d'ejaculat ($p < 0,05$).

^b Diferències significatives respecte la mostra de swim up ($p < 0,05$).

resposta cel·lular al dany (Li *et al.*, 2016), en cèl·lules germinals masculines les alteracions de la integritat de l'ADN espermàtic donen lloc a un estat clínic d'infertilitat (Bach i Schlegel, 2016; Ribas-Maynou *et al.*, 2012b; Simon i Lewis, 2011). Les opcions terapèutiques en aquests pacients passen sovint per la realització de la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI), procediment que es diferencia de la resta de tractaments de reproducció assistida per la selecció mitjançant micromanipulació d'espermatozoides amb bones característiques de morfologia i motilitat que s'utilitzen en la fecundació dels oòcits. En relació a la ICSI, els estudis més recents mostren una falta d'associació entre els resultats de fragmentació de l'ADN mesurada en l'ejaculat utilitzant les tècniques SCD i TUNEL, i el desenvolupament embrionari preimplantacional o la taxa implantació (Bach i Schlegel, 2016; Esbert *et al.*, 2011). Aquests resultats discordants s'atribueixen al biaix causat en la selecció d'aquests espermatozoides respecte l'anàlisi en la mostra d'ejaculat. Amb l'objectiu de reduir al màxim aquest biaix, i davant la impossibilitat d'estudiar el mateix espermatozoide que s'utilitzarà per a la reproducció assistida, s'ha posat a punt un sistema de fixació d'espermatozoides seleccionats amb micromanipulador que permet l'anàlisi de trencaments en l'ADN sobre aquest subgrup cel·lular amb quatre tècniques diferents: Comet neutre, Comet alcalí, SCD i TUNEL.

El sistema desenvolupat (Figura 1) ha donat lloc a una eficiència d'anàlisi del 77% de mitjana (Taula 1). D'una banda, aquesta aproximació mostra una reducció estadísticament significativa de la fragmentació de cadena senzilla de l'ADN espermàtic en relació a la mostra d'ejaculat i swim-up (Taula 1 i Figura 2), fet que posa de manifest la diferència entre la mostra d'ejaculat

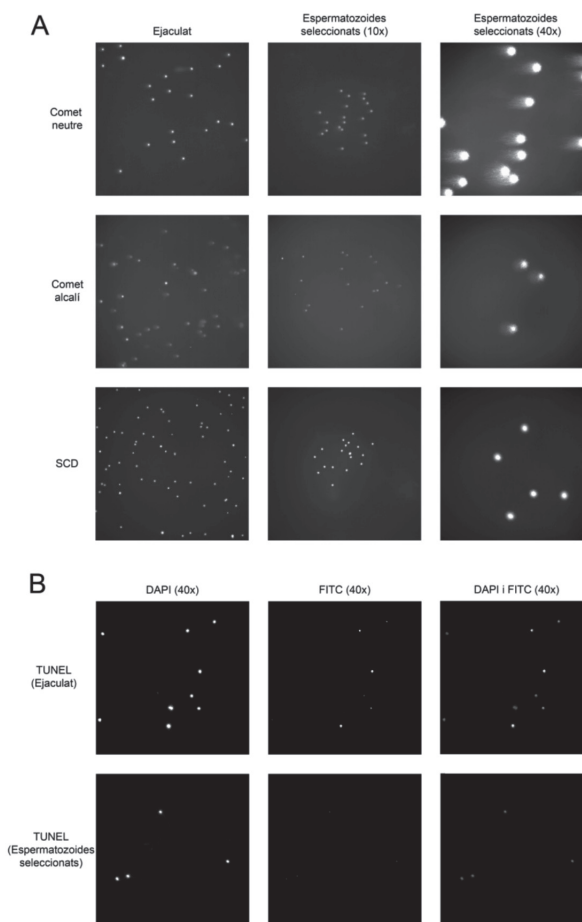


Figura 1. Fragmentació de l'ADN espermàtic de cadena doble estudiat amb Comet neutre (A). Fragmentació de cadena senzilla estudiat mitjançant Comet alcalí i SCD (A) i TUNEL (B).

i els espermatozoides utilitzats en ICSI. Aquest resultat podria donar explicació a la falta d'associació entre la fragmentació de l'ADN mesurada mitjançant SCD o TUNEL en ejaculat i les taxes de implantació en cicles de ICSI (Bach i Schlegel, 2016; Esbert *et al.* 2011). En diversos estudis s'han relacionat els trencaments de cadena senzilla de l'ADN espermàtic mesurats amb Comet alcalí, SCD i TUNEL amb la motilitat progressiva i la morfologia espermàtica (Aitken i De Iuliis, 2010; Ribas-Maynou *et al.* 2012a; Simon i Lewis, 2011). Així doncs, una reducció d'aquest tipus de trencaments és esperable al seleccionar un subgrup d'espermatozoides amb bona motilitat i morfologia.

D'altra banda, no s'ha observat una reducció de la fragmentació de cadena doble en mostres d'espermatozoides seleccionats sota criteris d'ICSI respecte la mostra d'ejaculat i de swim-up (Taula 1 i Figura 2). Així doncs, el percentatge d'espermatozoides amb alteracions del tipus dsSDF en la mostra d'ejaculat i en el subgrup d'ICSI sembla ser similar, evidenciant que aquest tipus de dany podria ser el majoritari en els espermatozoides utilitzats per a fecundar en ICSI. En aquest sentit, estudis previs del nostre centre mostren una associació entre els trencaments de cadena doble amb una cinètica embrionària més lenta, pitjors taxes d'implantació en tractaments de ICSI (A Casanovas, dades no publicades) i major incidència d'avortaments (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b)..

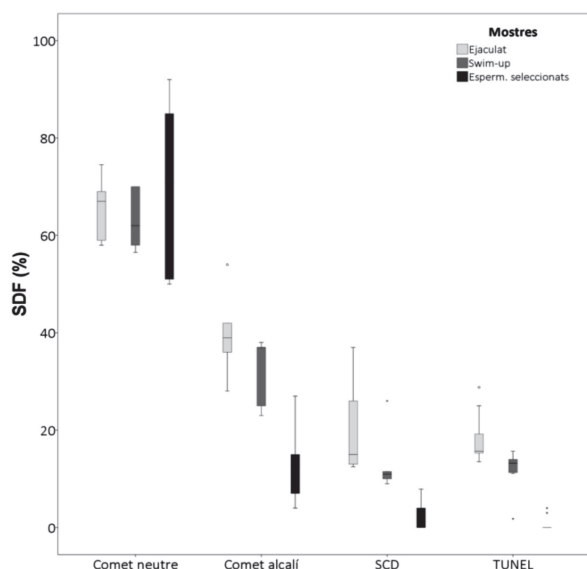


Figura 2. Comparativa dels valors de fragmentació de l'ADN espermàtic (SDF%) amb Comet neutre (n=5), Comet alcalí (n=5), SCD (n=6) i TUNEL (n=9) en mostres d'ejaculat, mostres després del swim-up i en espermatozoides seleccionats sota criteris d'ICSI.

CONCLUSIÓ

La fragmentació de l'ADN espermàtic de cadena doble, i no la de cadena senzilla, podria representar el risc predominant d'alteració del material genètic masculí en parelles que se sotmeten a cicles d'ICSI. La ampliació del grup d'estudi amb més pacients analitzats amb les quatre tècniques de fragmentació de l'ADN espermàtic és necessària per a la confirmació dels presents resultats.

REFERÈNCIES

- Aitken, RJ [et al.] 2013. "The Source and Significance of DNA Damage in Human Spermatozoa; a Commentary on Diagnostic Strategies and Straw Man Fallacies." *Mol Hum Reprod* 19(8): 475–85.
- Aitken, RJ and GN De Iuliis. 2010. "On the Possible Origins of DNA Damage in Human Spermatozoa." *Mol Hum Reprod*. 16(1): 3–13.
- Bach, PV [et al.] 2016. "Sperm DNA Damage and Its Role in IVF and ICSI." *Basic Clin Androl* 26(1): 1–10.
- Calhaz-Jorge, C [et al.] 2016. "Assisted Reproductive Technology in Europe, 2012: Results Generated from European Registers by ESHRE." *Human Reproduction* 31(8): 1638–52.
- Esbert, M [et al.] 2011. "Impact of Sperm DNA Fragmentation on the Outcome of IVF with Own or Donated Oocytes." *Reproductive BioMedicine Online* 23(6): 704–10.
- Jungwirth, A [et al.] 2012. "Male Infertility." *European Urology* 62(2): 324–32.
- Lewis, SEM [et al.] 2013. "The Impact of Sperm DNA Damage in Assisted Conception and beyond: Recent Advances in Diagnosis and Treatment." *Reproductive BioMedicine Online* 27(4): 325–37.
- Li, Z [et al.] 2016. "DNA Mismatch Repair and the DNA Damage Response." *DNA Repair (Amst)* 38: 94–101.
- Pastuszek, E [et al.] 2017. "An Investigation of the Potential Effect of Sperm Nuclear Vacuoles in Human Spermatozoa on DNA Fragmentation Using a Neutral and Alkaline Comet Assay." *Andrology* (5): 392–98.
- Registro Nacional de Actividad. 2014. "Informe Estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida." *Registro SEF*: 0–48.
- Ribas-Maynou, J [et al.] 2012a. "Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor." *PLoS ONE* 7(9).

- Ribas-Maynou, J [*et al.*] 2012b. "Alkaline and Neutral Comet Assay Profiles of Sperm DNA Damage in Clinical Groups." *Human Reproduction* 27(3): 652–58.
- 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): 715–22.
- Sheikh, N [*et al.*] 2008. "Correlation between Sperm Parameters and Sperm DNA Fragmentation in Fertile and Infertile Men." *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 6(1): 13–18.
- Simon, L [*et al.*] 2016. "A Systematic Review and Meta-Analysis to Determine the Effect of Sperm DNA Damage on in Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection Outcome." *Asian journal of andrology* (February): 1–11.
- Simon, L and SEM Lewis. 2011. "Sperm DNA Damage or Progressive Motility: Which One Is the Better Predictor of Fertilization in Vitro?" *Systems biology in reproductive medicine* 57(3): 133–38.
- Watanabe, S [*et al.*]. 2011. "An Investigation of the Potential Effect of Vacuoles in Human Sperm on DNA Damage Using a Chromosome Assay and the TUNEL Assay." *Human Reproduction* 26(5): 978–86.