

ANÀLISI DE FRAGMENTACIÓ DEL DNA ESPERMÀTIC MITJANÇANT L'ASSAIG COMET ALCALÍ I NEUTRE: APLICACIÓ D'UN SOFTWARE D'ANÀLISI COMPUTERITZADA

Sergio Garcia-Segura¹, Jordi Ribas-Maynou², Agustí Garcia-Peiró², Jordi Benet^{1*}

¹Departament de Biologia Cel·lular Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

²CIMAB, Centre de Infertilitat Masculina i Anàlisis de Barcelona, Parc de Recerca de la UAB, Campus de la UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona.

Sergio.Garcia.Segura@uab.cat, Jordi.Benet@uab.cat

Resum

Estudis recents relacionen la fragmentació del DNA espermàtic de cadena senzilla (ssSDF) amb la capacitat d'aconseguir un embaràs de forma natural i la fragmentació de cadena doble (dsSDF) amb un risc incrementat d'avortaments. L'assaig Comet permet analitzar aquests dos tipus de dany mitjançant condicions alcalines per valorar la ssSDF i condicions neutres per la dsSDF. El present estudi té l'objectiu d'incorporar l'anàlisi computeritzada per estandarditzar la valoració dels resultats de la tècnica i aportar informació diagnòstica addicional. S'ha utilitzat el software Komet 7 per a capturar les imatges de l'assaig Comet, el qual calcula diferents paràmetres que mesuren la intensitat del dany al DNA. Aquest software s'ha posat a prova per a diverses variables i s'ha estudiat el perfil d'integritat del DNA espermàtic en diferents grups clínics. La posada a punt ha permès determinar que els paràmetres amb menys variació experimental en l'anàlisi de SDF són *Tail DNA*, *Tail Extent Moment*, *Olive Tail Moment* i *Tail Length*, amb els quals s'ha comprovat que l'anàlisi computeritzada aporta informació addicional al percentatge d'espermatozoides amb dany al DNA. L'anàlisi de fragmentació de DNA en 21 donants i 33 pacients infèrtils ha mostrat que la taxa d'avortaments depèn del percentatge d'espermatozoides amb dsSDF però no de la seva intensitat del dany, que es similar entre els pacients amb avortaments recurrents i la resta de grups clínics.

Paraules clau: fragmentació del DNA espermàtic; assaig Comet; anàlisi computacional.

Abstract

Current studies relate single strand sperm DNA fragmentation (ssSDF) with natural fertility and double strand sperm DNA fragmentation (dsSDF) with an increased risk of miscarriage. The Comet assay allows researchers to analyse these two types of damage by alkaline conditions to assess ssSDF and neutral conditions to assess dsSDF. This study aims to incorporate computerized analysis to standardize the assessment of the results of the technique and provide additional diagnostic information. Komet 7 software has been used to capture the images of the Comet assay, which has different parameters that measure the intensity of damage to DNA. This software has been tested by several variables and has studied the sperm DNA integrity profile in different clinical groups. The set-up allowed us to determine that the parameters with less experimental variation in SDF analysis are *Tail DNA*, *Tail Extent Moment*, *Olive Tail Moment* and *Tail Length*, which have verified that the computerized analysis provides additional information to percentage of sperm with DNA damage. DNA fragmentation analysis in 21 controls and 33 infertile patients showed that the miscarriage rate depends on the percentage of sperm with dsSDF but not the intensity of the damage, which is similar in patients with recurrent miscarriage and other clinical groups.

Key words: sperm DNA fragmentation; Comet assay; computerized analysis.

INTRODUCCIÓ

La infertilitat és una malaltia multifactorial on s'estima que aproximadament el 50% dels casos tenen un origen masculí (de Kretser, 1997). El seminograma és la eina bàsica d'anàlisi dels paràmetres seminals però el seu

valor diagnòstic es limitat (Lewis, 2007), pel que actualment s'exploren altres tests enfocats a estudiar els factors genètics. Una de les últimes tecnologies d'anàlisi més prometedores és l'estudi de la fragmentació del DNA espermàtic (SDF), el qual s'ha relacionat inversament amb diversos indicadors de salut reproductiva

com la taxa de fertilització, la d'implantació o la d'avortaments espontanis de repetició (Zini *et al.*, 2008; Lewis i Simon, 2010; Ribas-Maynou *et al.*, 2012a i 2012b). Una reducció de la integritat del DNA s'ha associat amb anomalies cromosòmiques i algunes malalties genètiques en els nounats com càncer infantil, leucèmies o autisme (Aitken *et al.*, 2009; Lewis i Simon, 2010).

Per estudiar la SDF s'han desenvolupat diverses metodologies que permeten quantificar el percentatge d'espermatozoides amb el DNA fragmentat i el dany del DNA nuclear, com l'assaig *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL), el *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), el *Sperm Chromatin Dispersion test* (SCD) o l'assaig Comet. Ara bé, s'ha evidenciat una gran variabilitat en els resultats d'aquestes tècniques, en gran part perquè encara no han estat estandarditzades i algunes presenten major sensibilitat que d'altres (Ribas-Maynou *et al.*, 2013). Aquella que sembla tenir una major sensibilitat i especificitat per detectar els nivells de fragmentació del DNA és l'assaig Comet, que consisteix en realitzar sobre les cèl·lules una lisi proteica i la descompactació del DNA en una matriu d'agarosa formant un halo de fibres de DNA. Posteriorment s'aplica una electroforesi en cèl·lula única per a que el material genètic fragmentat migri cap al pol positiu, formant una cua similar a un cometa, on la seva llargària i intensitat està directament relacionada a la intensitat del dany del DNA. És la única tècnica que permet una mesura quantitativa del dany del DNA en cada cèl·lula de forma individual (Lewis i Simon, 2010). L'assaig Comet es pot realitzar a pH alcalí, on es detecten trencaments de cadena senzilla, o a pH neutre, que majoritàriament detecta trencaments de cadena doble. Estudis recents han correlacionat la fragmentació de cadena senzilla del DNA espermàtic (ssSDF) amb la capacitat d'embaràs natural i la fragmentació de cadena doble del DNA espermàtic (dsSDF) amb el risc d'avortaments de repetició, a més han permès diferenciar dos perfils d'individus fèrtils segons els nivells de fragmentació de cadena doble que presenten (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a).

L'objectiu d'aquest estudi ha estat estandarditzar l'assaig Comet mitjançant la posada a punt d'un software d'anàlisi computeritzada per a la fragmentació del DNA espermàtic i comprovar el seu valor per al diagnòstic clínic de la infertilitat masculina comparant l'anàlisi convencional i la computeritzada.

MATERIALS I MÈTODES

Obtenció de les mostres espermàtiques

S'han recollit mostres seminals de 21 donants de banc de semen amb fertilitat provada i 38 pacients amb pro-

blemes de fertilitat procedents de centres de reproducció i hospitals de l'àrea de Barcelona; dels quals 13 presenten fallades d'implantació embrionària (FI), 12 presenten avortaments de repetició (AR), 13 idiopàtics (ID). Tots els donants van signar el consentiment informat i l'estudi va ser aprovat pel corresponent comitè ètic. Les mostres van ser obtingudes amb un mínim de 3 dies d'abstinència sexual i criopreservats en test-yolk buffer (14% glicerol, 30% rovell d'ou, 1,98% glucosa, 1,72% citrat sòdic) fins el seu anàlisi. Per a la posada a punt del software van ser utilitzades 5 mostres de pacients (3 FI, 1AR i 1 ID) combinades en una sola mostra per evitar variacions inter-individu. El valor clínic pels diferents paràmetres del software va analitzar-se utilitzant la resta de mostres.

Anàlisi de la fragmentació del DNA espermàtic

Per a l'anàlisi convencional, les mostres seminals de cada individu han estat analitzades mitjançant l'assaig Comet tant en condicions alcalines com neutres d'acord a la metodologia descrita anteriorment (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b). Per a l'anàlisi computeritzat, s'han emprat les mateixes extensions cel·lulars, la captació d'imatges s'ha fet mitjançant una càmera Zyla 5.5 (Andor Technology, Ulster, UK) integrada a un microscopi de fluorescència Olympus Provis AX70 (Olympus Corporation, Tokio, JP) i a un ordinador amb el software Komet 7.0.1 (Andor Technology, Ulster, UK), el qual permet obtenir un total de 34 paràmetres basats en la intensitat de llum fluorescent i la forma de la electroforesi de cada cèl·lula individual.

Per a la posada a punt de l'anàlisi informàtic s'han valorat les següents variables: a) temps d'exposició de les captures, b) mida de l'àrea de la regió d'interès (ROI), c) número mínim de cèl·lules a analitzar, d) ubicació de la extensió en el portaobjectes, e) temps de gel·lificació del portaobjectes i f) temps entre la tinció i l'anàlisi.

Per a l'anàlisi de la SDF en grups control i clínics s'han analitzat 100 espermatozoides per a cada mètode Comet, mantenint controlades les variables estudiades (veure Discussió). La valoració s'ha fet mitjançant el mètode convencional (càlcul del percentatge d'espermatozoides amb SDF) i el mètode computeritzat mitjançant els paràmetres *Tail DNA* (TD), *Tail Extent Moment* (TEM), *Olive Tail Moment* (OTM) i *Tail Length* (TL) del software Komet 7 tal i com s'ha justificat a la discussió.

Anàlisi estadística

S'ha utilitzat el programa informàtic SPSS Statistics v22.0 (Statistic Package for Social Science, SPSS Inc,

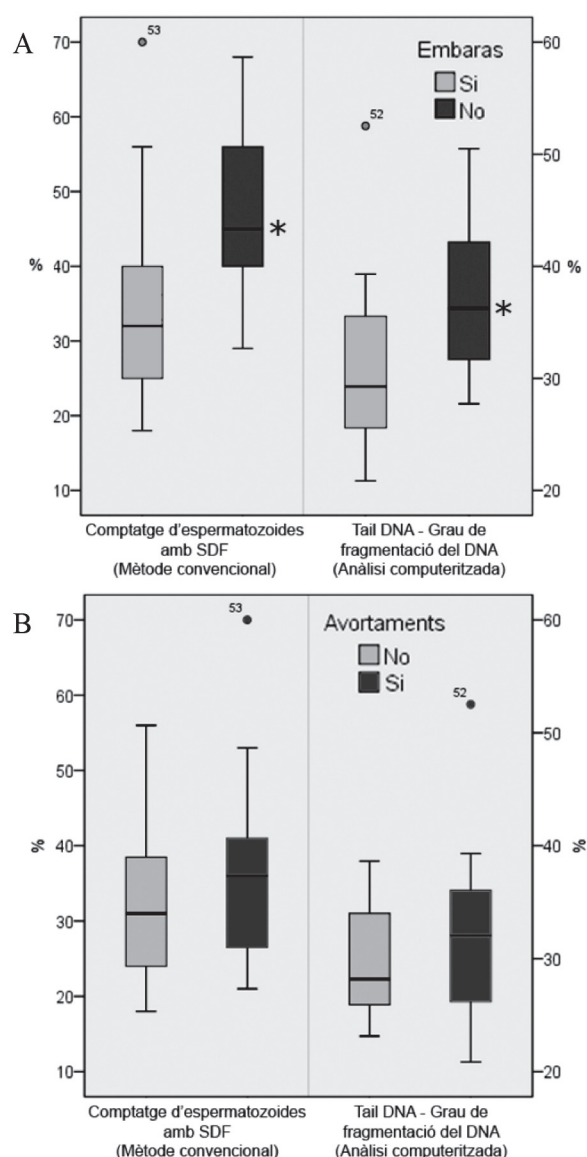


Figura 1. Fragmentació de cadena senzilla del DNA espermàtic: embarassos i avortaments. (A) Comparació del percentatge d'espermatozoides amb ssSDF (esquerra) i el percentatge de DNA a la cua dels Comets (dreta) entre donants/pacients amb embaràs o no. (B) Percentatge d'espermatozoides amb ssSDF (esquerra) i percentatge de DNA fragmentat (dreta) entre pacients amb avortaments o no. *diferències significatives $p < 0,05$.

Chicago, IL, USA) per a realitzar els estudis de normalitat amb els tests Shapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov, els estudis comparatius amb els tests U de Mann-Whitney, Kluskal-Wallis i Wilcoxon; i els estudis de correlació amb el coeficient de correlació de Spearman. Per a tots els tests estadístics es va considerar un nivell de significació de 0,05.

RESULTATS

Posada a punt del software Komet 7

Dels 34 paràmetres que calcula el software per a cada captura, s'ha determinat que els paràmetres que tenen una menor variació per les variables estudiades en l'anàlisi de la SDF han estat TD, TEM, OTM i TL (resultats sense detallar). Cap d'aquests paràmetres es veu alterat al variar el temps d'exposició de les captures, la ubicació de l'extensió en el portaobjectes o el temps entre la tinció i l'anàlisi de la mostra, i capturant 100 espermatozoides per mostra només es comet un error proper al 5%. Tot i així, aquests quatre paràmetres mostraven variacions si es modificava la mida de la ROI i el temps de preparació del gel electroforètic sobre el portaobjectes, paràmetres estandarditzats al laboratori.

Relació de la SDF amb embarassos i avortaments pel mètode d'anàlisi convencional i el computacional

L'anàlisi convencional de l'assaig Comet, que consisteix en calcular el percentatge d'espermatozoides amb SDF de la mostra, ha posat de manifest que els individus que han donat lloc a un embaràs (donants i pacients amb AR) presenten una mediana de 32% d'espermatozoides amb ssSDF i una mediana de 56% d'espermatozoides amb dsSDF, mentre que els pacients que no aconsegueixen cap sac gestacional (idiopàtics i FI) presenten una mediana de 45% d'espermatozoides amb ssSDF (significativament més elevat que per als que aconsegueixen embaràs, $p < 0.001$) i de 66% amb dsSDF (Taula 1). També s'ha pogut observar que els pacients amb AR presenten un 66% d'espermatozoides amb dsSDF, significativament superior ($p < 0.05$) als 41% de mediana que presenten els donants.

Els resultats de l'anàlisi computacional es mostren a la taula 1. Tots els paràmetres presenten una distribució molt semblant per a cadascun dels grups analitzats i per a l'anàlisi convencional, excepte per al grau de dsSDF en els pacients amb AR, que no presenta diferències amb els donants (Figura 2B). A les figures 1 i 2 es mostren els valors del paràmetre TD com a representatiu dels resultats obtinguts pel mètode computacional i els obtinguts amb el mètode convencional.

DISCUSSIÓ

L'anàlisi computeritzada de la SDF pretén estandarditzar la valoració de l'assaig Comet i millorar el diagnòstic aportant informació addicional a la obtinguda mitjançant l'anàlisi convencional (percentatge de espermatozoides amb SDF). La posada a punt ha permès identificar al-

Taula 1. Percentatge d'espermatozoides amb fragmentació (anàlisi convencional, %Z) i intensitat del dany del DNA que presenten els espermatozoides (anàlisi computacional). Mediane i rangs de l'anàlisi convencional i dels valors dels paràmetres del software per a cada grup clínic. S'indiquen els resultats per al Comet alcalí, ssSDF (S) i per al neutre, dsSDF (D).

		Embaràs		Avortaments	
		No	Si	No	Si
%Z	S	45,00 (40,00 – 56,00)	32,00 (25,00 – 40,00)	31,00 (23,00 – 39,00)	36,00 (26,00 – 42,00)
	D	66,00 (55,00 – 75,00)	56,00 (38,00 – 74,00)	41,00 (33,00 – 74,00)	66,00 (54,00 – 81,00)
TD	S	36,24 (31,68 – 42,17)	29,27 (25,59 – 35,53)	28,19 (25,59 – 35,32)	32,04 (24,81 – 36,61)
	D	15,81 (13,38 – 16,68)	16,28 (13,81 – 19,10)	16,61 (13,26 – 18,70)	16,14 (14,37 – 19,10)
TEM	S	2,10 (1,66 – 2,25)	1,52 (1,32 – 1,94)	1,44 (1,19 – 1,99)	1,69 (1,34 – 1,94)
	D	0,72 (0,53 – 0,82)	0,81 (0,55 – 1,02)	0,82 (0,54 – 1,00)	0,80 (0,61 – 1,21)
OTM	S	0,79 (0,68 – 1,02)	0,62 (0,53 – 0,80)	0,60 (0,53 – 0,79)	0,67 (0,55 – 0,81)
	D	0,27 (0,21 – 0,29)	0,30 (0,23 – 0,37)	0,30 (0,23 – 0,36)	0,29 (0,24 – 0,46)
TL	S	5,46 (5,27 – 5,93)	5,22 (4,82 – 5,43)	5,17 (4,58 – 5,50)	5,25 (4,98 – 5,43)
	D	4,74 (4,00 – 5,30)	4,78 (4,12 – 5,50)	4,82 (4,04 – 5,31)	4,78 (4,22 – 6,01)

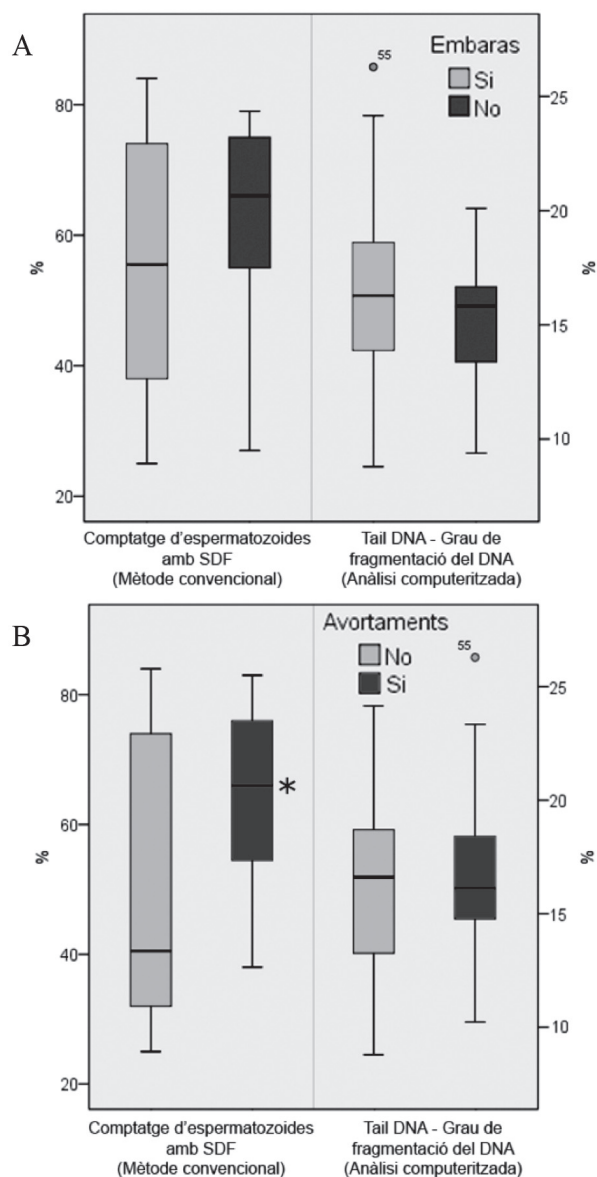


Figura 2. Fragmentació de cadena doble del DNA espermàtic: embarassos i avortaments. (A) Comparació del percentatge d'espermatozoides amb dsSDF (esquerra) i del percentatge de DNA a la cua dels Comets (dreta) entre donants/pacients amb embaràs o no. (B) Percentatge d'espermatozoides amb ssSDF (esquerra) i percentatge de DNA fragmentat (dreta) entre pacients amb avortaments o no. *diferències significatives $p < 0,05$.

guns passos crítics en el protocol i l'anàlisi fet amb el software que cal tenir en compte per tal d'evitar variacions inter-individu. Les diferències trobades segons el temps trigat en la gelificació del portaobjectes indiquen que cal mantenir-lo constant per evitar variacions en els resultats. Les variacions observades utilitzant diferents mides de la ROI quan es capturen les imatges amb el software poden estar causades per la captació de senyals inespecífiques, pel que es recomana ajustar la ROI al mínim possible dels marges del cometa per tal de minimitzar al màxim aquest error en l'anàlisi. Mantinent aquestes dues variables controlades, els paràmetres TD, TEM, OTM i TL són els menys afectats per variables externes i els més eficients per analitzar la intensitat del dany al DNA espermàtic. Els quatre paràmetres escollits han estat utilitzats i recomanats per a estudis de dosimetria biològica o toxicologia genètica en càncer o radiacions ionitzants (Tice *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2013).

L'optimització de l'assaig Comet ha estat i encara és un objectiu important a resoldre. Recentment s'ha proposat estandarditzar els diferents passos de la metodologia, ja sigui homogeneïtzant el protocol de l'assaig automatitzant el procés (HT-Comet) (Albert *et al.*, 2016) o, com el present estudi, incorporant un software d'anàlisi que estandarditzi la valoració dels resultats (Simon *et al.*, 2017). Aquests autors coincideixen a destacar el valor clínic del percentatge d'espermatozoides

amb SDF així com a escollir els paràmetres TD i OTM que també s'han seleccionat en el present treball.

Utilitzant aquests paràmetres per valorar els resultats dels assaig Comet es veu que els pacients que no aconsegueixen un sac gestacional presenten un percentatge d'espermatozoides amb ssSDF i una intensitat del dany de cadena simple al DNA més elevada que els que aconsegueixen embaràs ($p < 0,05$) (Figura 1A), però mostren uns nivells de dsSDF semblants (Figura 2A). Aquests resultats recolzen la hipòtesi de que la ssSDF és informativa de la taxa de fertilitat dels individus de la població, tant si és avaluada mitjançant el percentatge d'espermatozoides afectats com per la intensitat del dany al DNA espermàtic (Lewis i Simon, 2010; Simon *et al.*, 2010). En relació als individus que aconsegueixen embarassos, els pacients amb avortaments presenten un major percentatge d'espermatozoides amb dsSDF ($p < 0,05$) (Figura 2B) però una intensitat de dany de doble cadena similar als donants de fertilitat coneguda (Figura 2A), fet que recolza la hipòtesi de que la dsSDF és informativa de la taxa d'avortaments dels individus de la població (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a) i suggerint que podria ser més rellevant la quantitat d'espermatozoides amb dany de cadena doble del DNA que la intensitat d'aquest dany. En aquest sentit, en relació a patir un avortament, pot ser tan deleteri un trencament que afecti un fragment cromosòmic que múltiples trencaments que afectin el mateix fragment. En tots dos casos produeix un efecte similar, de fet, tant petites com grans delecions poden provocar pèrdua de gens importants per al desenvolupament embrionari o reorganitzacions cromosòmiques relacionades amb avortaments de repetició (Varga i Aplan, 2005; Stephenson i Sierra, 2006; Fort i Schust, 2009; Ocak *et al.*, 2013).

Així doncs, l'estandardització de l'assaig Comet alcalí i neutre per a l'anàlisi de la fragmentació del DNA espermàtic millora la informació aportada per al diagnòstic de pacients infèrtils, especialment en la taxa d'embaràs per al Comet alcalí i en la taxa d'avortaments per al Comet neutre.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha rebut suport econòmic de ISCIII i FEDER (projecte PI14-00119) i de la Generalitat de Catalunya (projecte 2014SGR-0903). S. Garcia és beneficiari de una beca PIF 2016 de la UAB.

BIBLIOGRAFIA

Aitken, R.J. [et al.] (2009). «Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line».

International Journal of Andrology, vol. 32, núm. 1, p. 46-56.

Albert, O. [et al.] (2016). «HT-COMET: a novel automated approach for high throughput assessment of human sperm chromatin quality». *Human Reproduction*, vol. 31, núm. 5, p. 938-946.

de Kretser, D.M. (1997). «Male infertility». *Lancet*, vol. 349, núm. 9054, p. 787-790.

Ford, H.B. i Schust, D.J. (2009). «Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy». *Reviews in obstetrics & gynecology*, vol. 2, núm. 2, p. 76-83.

Lewis, S.E.M. (2007). «Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?». *Reproduction*, vol. 134, núm. 1, p. 31-40.

Lewis, S.E.M. i Simon, L. (2010). «Clinical implications of sperm DNA damage». *Human fertility*, vol. 13, núm. 4, p. 201-207.

Ocak, Z. [et al.] (2013). «Association of recurrent pregnancy loss with chromosomal abnormalities and hereditary thrombophilias». *African health sciences*, vol. 13, núm. 2, p. 447-452.

Ribas-Maynou, J. [et al.] (2012). «Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups». *Human Reproduction*, vol. 27, núm. 3, p. 652-658.

Ribas-Maynou, J. [et al.] (2012). «Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet Assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor». *PLoS ONE*, vol. 7, núm. 9, e44679.

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*, vol. 1, núm. 5, p. 715-722.

Simon, L. [et al.] (2017). «Sperm DNA damage output parameters measured by the alkaline Comet assay and their importance». *Andrologia*, vol. 49, núm. 2, e12608.

Simon, L. [et al.] (2010). «Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome». *Human Reproduction*, vol. 25, núm. 7, p. 1594-1608.

Stephenson, M.D. i Sierra, S. (2006). «Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement». *Human reproduction*, vol. 21, núm. 4, p. 1076-1082.

Tice, R.R. [et al.] (2000). «Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing». *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 35, núm. 3, p. 206-221.

Varga, T. i Aplan, P.D. (2005). «Chromosomal aberrations induced by double strand DNA breaks». *DNA repair*, vol. 4, núm. 9, p. 1038-1046.

- Wang, Y. [*et al.*] (2013). «Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation». *International journal of molecular sciences*, vol. 14, núm. 11, p. 22449-22461.
- Zini, A. [*et al.*] (2008). «Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis». *Human reproduction*, vol. 23, núm. 12, p. 2663-2668.