



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA / DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO
CLINICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA HISPAREP

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ANTIOXIDANTES EN
PACIENTES CON ELEVADO ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL
ADN ESPERMÁTICO EN LA CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN
HISPAREP.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUB - ESPECIALISTA EN:
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

PRESENTA

DR. JOSÉ LUIS RIVAS AGUILAR

ASESOR DE TESIS

DR. SERGIO TELLEZ VELASCO

PROFESOR TITULAR

DR. CARLOS GERARDO SALAZAR LOPEZ ORTIZ

MÉXICO, CIUDAD DE MEXICO

MARZO 2017.



HOSPITAL ESPAÑOL



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIONES

-

DR. MANUEL ÁLVAREZ NAVARRO

Jefe del Departamento de Enseñanza e Investigación

-

DR. CARLOS GERARDO SALAZAR LOPEZ ORTIZ

Profesor Titular del Curso de Biología de la Reproducción Humana

-

Dr. SERGIO TELLEZ VELASCO

Asesor de Tesis.

ÍNDICE

Introducción.....	4
1. Antecedentes	
2. Aplicación Clínica	
3. Factores que influyen en las mediciones de la fragmentación espermática.	
Planteamiento del Problema.....	15
Hipótesis.	16
Justificación.....	17
Objetivos.....	18
Material y Métodos.....	19
Resultados.....	20
Discusión.....	22
Conclusión.....	23
Referencia Bibliográfica.....	24

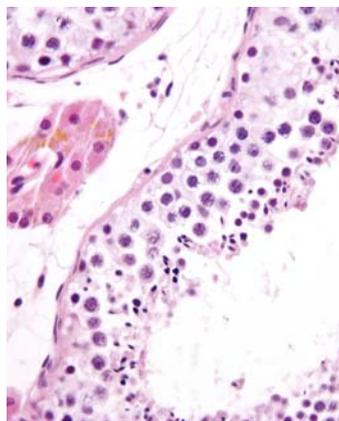
“The history of prenatal diagnosis has roots in the eugenics movement...part of its history has been an attempt to control the gates of life: to decide who is, and who is not, fit to make a contribution to the gene pool.”

Barbara Katz Rothman

Introducción.

Antecedentes

La espermatogénesis es un proceso que se lleva a cabo en los testículos (gónadas), las cuales son glándulas sexuales masculinas. En su interior se encuentran los túbulos seminíferos, pequeños conductos enrollados de 30-60 cm de longitud y 0,2 mm de diámetro cada uno. Los dos testículos contienen alrededor de un millar de túbulos seminíferos. En el epitelio de los túbulos asientan las células germinativas o espermatogonias y la liberación del empaquetamiento del ADN de los espermatozoides en la pubertad. También es el mecanismo encargado de la producción de espermatozoides; es la gametogénesis en el hombre. Este proceso se produce en las gónadas, activado por la hormona GnRH que se produce en el hipotálamo, y la maduración final de los espermatozoides se produce en el epidídimo. La espermatogénesis tiene una duración aproximada de 62 a 75 días en la especie humana y consta de tres fases o etapas: mitosis o espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis o espermiogénesis.



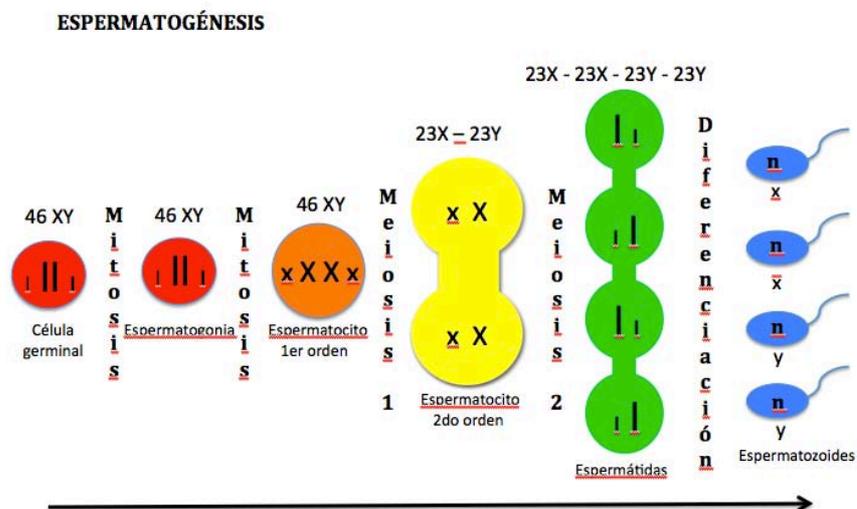
(Fig. 1) ^{1,2}

Figura 1. Túbulos seminíferos con espermatozoides maduro

Los espermatozoides son células haploides que tienen la mitad de los cromosomas que una célula somática, son móviles y son muy diferenciadas. La reducción en ellas se produce mediante una división celular peculiar, la meiosis en el cuál una célula diploide ($2n$), experimentará dos divisiones celulares sucesivas sin un paso de duplicación del ADN entre dichas divisiones, con la capacidad de generar cuatro células haploides (n). En este proceso es necesario pasar de unas células diploides, inmóviles e indiferenciadas a otras haploides, móviles y muy diferenciadas.

Espermiogenesis: los gametos así producidos siguen el proceso de maduración conocido como espermiogénesis, donde en dicha fase las espermátidas se convierten en espermatozoides; para ello, se reduce el citoplasma, el núcleo de la célula se alarga, queda en la cabeza del espermatozoide generando la forma puntiaguda característica de este tipo de células y finalmente se forma el flagelo que permite el movimiento.

Por tanto, se trata de la última fase de la espermatogénesis, en la que tiene lugar la maduración de las espermátidas hasta adquirir las estructuras morfológicas del espermatozoide. Este proceso se lleva a cabo en cuatro eventos que ocurren simultáneamente. 1) Condensación de Núcleo, 2) Formación del acrosoma, 3) Formación del Flagelo, 4) Reducción del citoplasma. Así, los espermatozoides presentan tres zonas bien diferenciadas: la cabeza, el cuello y la cola. La primera es la de mayor tamaño, contiene los cromosomas de la herencia y lleva en su parte anterior un pequeño saliente o acrosoma cuya misión es perforar las envolturas del óvulo. En el cuello se localiza el centrosoma y las mitocondrias, y el flagelo, que se origina a partir de los centriolos, es el filamento que se encarga de generar la motilidad que le permite al espermatozoide «nadar» hasta el óvulo para fecundarlo.



Fragmentación de ADN espermático

La fragmentación del ADN espermático, tal y como indica su nombre, se refiere a roturas o lesiones en el material genético del espermatozoide.

A mayor número de lesiones, menor será la integridad del material genético y las probabilidades de que se produzca un embarazo a término.

En cualquier etapa de la espermatogenesis y espermiogénesis se puede producir un daño en el ADN espermático. (2) Sobre la naturaleza de este daño se sabe que es un fenómeno multifactorial y no del todo delimitado. Se conocen algunos factores que pueden producir daño irreversible en el ADN del gameto masculino como son: -Generación de radicales libres de oxígeno ó estrés oxidativo (3,4)-Empaquetamiento anormal de la cromatina (errores en la sustitución de histonas por protaminas) (5,6). -Deficiencias en la recombinación (7). -Apoptosis tras la salida del espermatozoide a los túbulos. -Causas externas que pueden provocar o potenciar los efectos anteriores como determinadas condiciones ambientales (contaminación, tabaquismo, temperatura testicular elevada) o patológicas (criptorquidia, varicocele, procesos inflamatorios o infección del tracto genital, cáncer, episodios febriles, estrés).

Tres hipótesis.

- Factor Intrínseco. Defectos en la maduración durante la espermatogénesis. fallo en el remodelación de cromatina y protaminación ineficiente.
- 2. Factor extrínseco: Edad paterna avanzada, dieta hipercalórica, uso de drogas, medicamentos, exposición a insecticidas, consumo de tabaco, varicocele, cancer, hipertermia, contaminación ambiental, infección genital, así como inflamación genital, obstrucción del tracto reproductivo.
- 3. Apoptosis. Proceso fisiológico interno que obedece como respuesta a estrés oxidativo. Defectos en el proceso de apoptosis pueden derivar en liberación anormal de radicales oxidativos.

Aplicación Clínica

Se han realizado varios trabajos que evidencian la relación existente entre la integridad del ADN espermático y la fertilidad. Estos trabajos demuestran que los varones infértiles tienen una mayor fracción de espermatozoides con roturas en el ADN.

En Europa y EEUU se llevaron a cabo de forma independiente dos amplios estudios sobre la relación entre los resultados de la técnica SCSA y la capacidad fertilizante (11, 25). Ambos demostraron que un índice de fragmentación del ADN (DFI) superior al 30-40% es incompatible con la fertilidad in vivo, independientemente de la concentración, motilidad y morfología espermática. Evenson et al. (26), usando esta técnica establecieron cuatro categorías para el potencial fertilizante del espermatozoide según el DFI:

- excelente si DFI < 15%
- alto si DFI 15-24%
- bajo si DFI 25-30%

- muy bajo si DFI > 30%.

IMPACTO DEL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO Y LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA)

El éxito de las TRA depende de múltiples factores, y entre ellos la integridad estructural y funcional de los gametos usados. Por ello, la naturaleza de la infertilidad y su causa deberían ser analizadas antes de iniciar el tratamiento. En cuanto al gameto masculino y su material genético se ha demostrado que una fracción elevada de espermatozoides con defectos en la cromatina puede tener un impacto negativo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida (15, 29, 30, 31). Con frecuencia las muestras de semen que muestran altos niveles de daño en el ADN están asociadas a una disminución de las tasas de fertilización o implantación después de FIV/ICSI, y pueden dar lugar a mala calidad embrionaria, bloqueo embrionario o aborto. Aunque en estos procedimientos se seleccionan los espermatozoides de mejor motilidad y morfología, siempre hay un porcentaje de los mismos que contienen varios grados de daño en el ADN y que pueden alcanzar el ovocito con un mínimo o ningún esfuerzo (FIV o ICSI). Diversos autores han correlacionado los valores de fragmentación con los resultados de las TRA para intentar establecer un punto de corte a partir del cual se pueda predecir el resultado de las mismas. Lograrlo supondría aumentar notablemente las tasas de éxito, reducir el número de ciclos innecesarios y conseguir finalmente una eficiencia mayor de la técnica de reproducción asistida empleada lo que redundaría no sólo en mayores tasas de embarazo sino también en menor coste socio-económico

RELACIÓN ENTRE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y TASA DE FERTILIZACIÓN

En cuanto a la relación que existe entre el DFI y la tasa de fertilización en TRA los resultados son controvertidos. Larson-Cook et al. (22), Sakkas et al. (32) y Morris et al. (33) observaron que ambos parámetros no estaban relacionados. Sin embargo otros autores como Sun et al. (17), Lopes et al. (15) y Saleh et al. (34) demostraron una correlación negativa entre fragmentación del DNA y tasa de fertilización tras FIV/ICSI. Un nivel de daño elevado en el DNA estaba asociado con una baja tasa de fertilización. Virro et al. (35) determinaron la relación entre los resultados de SCSA y los resultados de FIV/ICSI. Las tasas de fertilización con FIV/ICSI no

fueron estadísticamente significativas entre grupos con alto y bajo DFI. Henkel et al. (36) usando la técnica TUNEL tampoco encontraron correlación entre el DFI y la tasa de fertilización en ciclos de FIV/ICSI

RELACIÓN ENTRE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y DESARROLLO EMBRIONARIO.

Las primeras etapas del desarrollo embrionario están sometidas al control materno y la expresión de los genes paternos comienza en el estadio de 4-8 células; en ese momento las alteraciones del ADN paterno se ponen de manifiesto, perjudicando el desarrollo del embrión y produciendo bloqueo embrionario, que puede explicar ciertos fallos de implantación, embarazos bioquímicos o abortos clínicos (37). El efecto paterno a veces es aparente ya en el estadio embrionario de pronúcleos (efecto paterno temprano), y se ha sugerido que puede deberse a una deficiencia de factores activadores del ovocito (38), o a un elevado nivel de fragmentación que pueda exceder la capacidad reparadora del mismo (39). Pero la implicación de la fragmentación del ADN espermático en este estadio todavía es un tema controvertido. Tras observar un efecto negativo de una elevada fragmentación en los resultados de las TRA (40, 29, 33, 41), se ha sugerido que el daño en el ADN del gameto masculino podría considerarse un marcador para el estudio de la implicación paterna en el desarrollo preimplantacional en humanos. Así Tesarik et al. (42) demostraron que un alto nivel de fragmentación del ADN espermático normalmente no se asocia con anomalías morfológicas en los estadios embrionarios iniciales pero afecta a la tasa de implantación (efecto paterno tardío). Estos autores proponen que un análisis de la fragmentación del ADN espermático es un buen método diagnóstico para revelar la causa paterna de los repetidos fallos de implantación en ICSI con embriones de buena calidad morfológica.

RELACIÓN ENTRE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y TASA DE EMBARAZO

Con un DFI de 20-40% se supone que más de la mitad de los espermatozoides están intactos, pero sin embargo no dan lugar a un desarrollo embrionario normal según la mayoría de los datos obtenidos hasta ahora. Este hecho podría deberse a dos razones: * En primer lugar, es

posible que el daño en el ADN detectable sólo represente la punta del iceberg y que exista un daño oculto en la mayoría de los espermatozoides que dan negativo en las técnicas usadas para medir fragmentación. * Y en segundo lugar puede ocurrir que la fragmentación del ADN espermático esté asociada con anomalías cromosómicas (aneuploidías). Muriel et al. (49) observaron que la tasa de aneuploidías era $4,6 \pm 2,0$ mayor en espermatozoides con roturas en el ADN. La aneuploidía durante la maduración espermática puede dar lugar a una fragmentación del ADN como un mecanismo desarrollado para inactivar el espermatozoide genéticamente defectuoso, o bien porque durante la recombinación genética la existencia de roturas en el ADN de lugar a aneuploidías.

REDUCCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO CON ANTIOXIDANTES ORALES

Estudios previos han sugerido la implicación del estrés oxidativo en la etiología de las roturas del ADN espermático. Por ello se cree que el tratamiento con antioxidantes puede disminuir este daño. Se ha estandarizado un tratamiento por vía oral consistente en la administración diaria de 1g de vitamina C y 1g de vitamina E durante dos meses porque existen estudios que demuestran una reducción significativa de la fragmentación del ADN espermático tras dicho tratamiento.

En el estudio de Greco et al. (61) la fragmentación disminuyó notablemente del 22% al 9% en un grupo de 64 pacientes tras la administración del tratamiento anterior. Aunque no se observaron mejoras significativas de la concentración, motilidad y morfología espermática, si se demostró el efecto protector de los antioxidantes en la integridad del ADN espermático. En un estudio llevado a cabo por los mismos autores en 38 pacientes con DFI (TUNEL) superior al 15% y dos o más ciclos ICSI sin embarazo, se demostró un descenso del DFI en el 76% de los casos después del tratamiento antioxidante. Al realizar un nuevo ciclo ICSI después de dicho tratamiento no se obtuvieron diferencias en tasas de fertilización ni en morfología embrionaria respecto a los ciclos anteriores pero si en tasas de implantación y de embarazo clínic

TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Las técnicas que existen para estudiar la fragmentación del ADN espermático se pueden dividir en dos grupos. En primer lugar se encuentran aquellas que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos. En este grupo se encuentran las siguientes: * SCSA o Sperm Chromatin Structure Assay- DBD-FISH o DNA Breakage Detection Fluorescence In Situ Hybridization- SCD o Sperm Chromatin Dispersion - Ensayo cometa. Y en el segundo grupo se incluyen aquellas que marcan las roturas en la cadena de ADN, porque incorporan moléculas marcadas con fluorocromos en los extremos de rotura: TUNEL o Terminal dUTP Nick-End Labeling - ISNT o In Situ Nick Translation.

SCD o Sperm Chromatin Dispersión

Esta técnica consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina en aquellos espermatozoides que tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen. Este efecto se consigue mediante un tratamiento ácido seguido de una desproteización, de forma que los espermatozoides con fragmentación no liberan bucles de ADN y no generan un halo de dispersión de la cromatina. Por el contrario los que no están fragmentados dan lugar a grandes halos de dispersión que corresponden a bucles de ADN.

Planteamiento del Problema:

¿Es posible mejorar los niveles de fragmentación de ADN espermático con la suplementación de antioxidantes como única alternativa?

Hipótesis:

La suplementación con antioxidantes en pacientes con elevado índice de fragmentación del ADN espermático, mejora los niveles de fragmentación de ADN espermático.

Objetivo:

Demostrar el efecto positivo de diversos antioxidantes sobre la fragmentación espermática de ADN en pacientes con niveles de fragmentación elevada.

Justificación:

La fragmentación de ADN elevada es una causa directa en resultados adversos en técnicas de reproducción asistida así como en resultados perinatales. Uno de los parámetros a evaluar en el factor masculino aparte de la espermatobioscopia directa es la fragmentación de ADN la cual en sus resultado nos arroja el potencial fertilizante y de forma indirecta el pronostico y resultado obstétrico de dicha muestra.

En últimos años se ha observado que el uso de antioxidantes logra mejorar de manera positiva dicho parámetro. sin embargo hacen falta estudios que puedan comprobar su verdadera eficacia.

Materiales y Métodos:

Estudio longitudinal experimental que incluye pacientes con índice de fragmentación de ADN espermático elevado, sin enfermedades concomitantes a los que se les inició tratamiento con antioxidantes de la marca AMS (The Supreme Universal Fertility MFS Plus, SpermCount Max, Motility Max) Marcas registradas de la compañía (AMS) America Medic & Science all rights reserved. Iniciando el proyecto en Octubre 2016 con reevaluaciones a los tres meses post inicio de tratamiento y que continuará captando pacientes.

Se realizó fragmentación de ADN espermático con prueba de dispersión de cromatina en la clínica HISPAREP y se inició tratamiento al momento de obtener los resultados durante tres meses dosis establecida previamente por el laboratorio AMS

Todas las fragmentaciones de ADN espermático fueron realizadas por el Biólogo Pedro Cuapio Padilla con el kit.

Análisis Estadístico:

En el análisis estadístico se aplicó un coeficiente de correlación de Pearson para establecer la fuerza de asociación entre variables cuantitativas continuas.

Variabes a estudiar:

Nivel de Fragmentación de ADN previo a tratamiento y posterior a tratamiento.

Variable Dependiente o Intervención

Antioxidantes AMS

Variable Independiente

Nivel de fragmentación espermática de ADN

Variables cuantitativas continuas

Nivel de fragmentación de ADN espermático previo a tratamiento y posterior a tratamiento.

Criterios de inclusión:

- Pacientes masculinos sanos.
- Niveles elevados de fragmentación de ADN espermático

Criterios de Exclusión:

- Pacientes masculinos con algún tipo de enfermedad que pueda afectar el nivel de fragmentación de ADN espermático.

Resultados:

Se cuenta al momento con una muestra total de 3 pacientes los cuales cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión antes mencionados. (Tabla 2)

Tabla 2. Muestra de pacientes.

PACIENTE	F.PREVIA	F. POSTERIOR
001	N	533
002	N	532
003	N	532

Discusión:

Actualmente, la administración de antioxidantes es la principal herramienta para lograr mejoría en los índices de fragmentación elevados de ADN espermático. Al día de hoy el biólogo de la reproducción se enfrenta con este reto al cursar con pacientes que sin otro tipo de alteración espermática o enfermedad concomitante cursan con índices de fragmentación de ADN elevada.

El presente trabajo estudia la posible mejoría en los niveles de fragmentación de ADN espermático elevado al administrar antioxidantes como parte del tratamiento para dicha condición.

La realización del presente estudio encuentra justificación en la escasa información existente sobre la eficacia de dicho tratamiento al ser lo único actualmente descrito que puede mejorar este tipo de alteración.

En nuestro estudio tomamos en cuenta solo pacientes sanos que cursaron con índices de fragmentación de ADN espermático elevado los resultados hasta el día de hoy muestran una mejoría considerable si bien no estadísticamente significativa ya que nuestra muestra es muy reducida de misma manera se evaluarán en un futuro si estos pacientes una vez terminado el tratamiento cursaron con mejores resultados en su tratamiento de reproducción asistida. Las implicaciones clínicas que tienen estos resultados son de mucha importancia ya que hasta el momento es nuestra única arma para tratar dicha condición.

Por tanto, si se cuenta con un paciente que su única afección es una fragmentación de ADN espermático elevado se tendría que optar por iniciar tratamiento esperar a cumplir el tiempo de dicho tratamiento y entonces realizar el la técnica de reproducción asistida indicada.

Por último, no podemos dejar a un lado la gran variedad de factores que pueden afectar la fragmentación de ADN espermático ya que se desconocen los hábitos diarios de cada paciente así como la epigenética que no podemos dejar a un lado sin embargo la intervención con antioxidantes es al día de hoy la única intervención que podemos ofrecer a pacientes con índices elevados de fragmentación de ADN espermático.

Conclusiones:

Al momento no se cuenta con conclusión contundente ni estadísticamente significativa el estudio continuará realizándose en la clínica y al contar con muestra suficiente arrojará conclusiones.

(28) Jodi S. Dashe D. Maternal Obesity Limits the Ultrasound Evaluation of Fetal Anatomy,
J Ultrasound Med 2009; 28:1025–1030

