

Impacto de un complejo de antioxidantes sobre la fragmentación del ADN espermático en varones infértiles

Carlos Balmori Boticario, Cristina Areces Viña, Alberto Pacheco Castro, Marta San Celestino Carchenilla y Juan Antonio García Velasco

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Madrid. España.

RESUMEN

En los procesos de reproducción asistida ya no nos vale con conseguir espermatozoides, debemos conseguir los mejores espermatozoides. Dentro de los parámetros que hasta ahora se estudiaban estaba la concentración, la movilidad y la forma. Se observan diferencias en las tasas de éxito reproductivo, a pesar de sémenes con parámetros clásicos similares, por lo que se buscan otros marcadores de calidad seminal. Uno de ellos es el grado de fragmentación de ADN espermático. Se han visto claras relaciones entre valores de ADN elevados y dificultades reproductivas. Tradicionalmente, y de una manera empírica, el uso de vitaminas como la E y la C se han usado para mejorar la calidad espermática.

La relación entre los grados de fragmentación de ADN de espermatozoides y el exceso de radicales libres o el déficit de antioxidantes ha planteado que el suplemento de complejos o sustancias antioxidantes en varones infértiles puede mejorar su capacidad reproductiva al reducir los grados de fragmentación de ADN de los espermatozoides. En este trabajo pretendemos valorar la utilidad de un complejo de antioxidantes (Androferti® Laboratorio Q-Pharma) para reducir los niveles de fragmentación de ADN espermático.

Palabras clave: ROS. Espermatozoides. Infertilidad. Antioxidantes. Fragmentación de ADN de espermatozoides. Técnicas de reproducción asistida (TRA).

ABSTRACT

Impact of an antioxidant complex supplementation on sperm DNA fragmentation in infertile men

In assisted reproduction treatments it is no longer enough to obtain spermatozoa, we must find the best spermatozoa. Among the different parameters studied until recently, such as concentration, motility and morphology, varying success rates were observed even with similar classical sperm quality markers. Thus, research has been developed in order to find new markers of sperm quality. One of them is sperm DNA fragmentation. A close correlation between high sperm DNA fragmentation and poor reproductive outcome. Traditionally, and completely empirically, vitamins C and E have been used in an effort to improve sperm quality.

The relationship between sperm DNA fragmentation and the excess of free radicals and/or antioxidants deficit in infertile males has raised the question whether the supplementation with antioxidant substances may improve their reproductive outcome by reducing sperm DNA fragmentation. In this study, we evaluate the impact of an antioxidant complex (Androferti®, Laboratorio Q-Pharma) supplementation to infertile males in their sperm DNA fragmentation.

Key words: ROS. Spermatozoa. Infertility. Antioxidant. Sperm DNA fragmentation. Assisted reproductive technologies (ART).

Correspondencia: Dr. C. Balmori Boticario.
IVI Madrid.
Avda del Talgo, 68. 28023 Aravaca. Madrid. España.
Correo electrónico: cbalmori@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La incidencia de casos de infertilidad es variable según la población estudiada, pero se estima que la prevalencia (entendida como el número total de parejas infértiles frente al número total de parejas en el mismo tiempo y lugar) es de un 15%. Actualmente, en España hay alrededor de unas 900.000 parejas estériles, de las cuales aproximadamente la mitad acuden a los centros de fertilidad para tratar de corregir su problema. En el 20-30% de las parejas infértiles, la causa principal es masculina, presentando alteraciones en la función testicular, obstrucción de conductos, patologías en la próstata, y alteraciones en la eyaculación o erección¹.

Las clásicas valoraciones de la fertilidad masculina basadas en los 3 parámetros básicos del espermiograma: concentración, movilidad y morfología, conocidos y usados desde hace más de 50 años² se hacen insuficientes a la hora de buscar soluciones a los problemas de infertilidad masculina. Pacientes en los que su seminograma entra dentro de los parámetros de normalidad y, sin embargo, tienen problemas reproductivos, o pacientes que se encuentran en programas de fertilización artificial ante similares espermiogramas y técnicas usadas, obviando el factor femenino, no consiguen similares resultados. Todo ello nos lleva a pensar en que otros factores influyen en la infertilidad masculina.

Entre estos factores parece cada vez más evidente la influencia del estrés oxidativo³. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son los radicales libres específicos del estrés oxidativo celular. La búsqueda de un marcador de ese desequilibrio que supone el estrés oxidativo ha llevado a tener en cuenta el grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides⁴. Los incrementos de ROS llevan a un daño en el ADN espermático⁵. Las fuentes exógenas productoras de ROS son múltiples: sustancias químicas, exposición a altas temperaturas, consumo de alcohol y tabaco, y ejercicio físico intenso. Entre las endógenas tenemos: leucocitospermia, procesos febriles, inflamatorios o estrés⁶⁻⁸. La mayoría de estos procesos producen un exceso de ROS y un defecto de los sistemas antioxidantes, por tanto, la corrección de los factores nocivos antes descritos y la administración de sustancias antioxidantes deben resultar beneficiosas para la ferti-

lidad masculina⁹. En este trabajo, nos proponemos valorar la utilidad de un compuesto de antioxidantes (Androferti® laboratorios Q-Pharma) sobre la fragmentación del ADN espermático.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre octubre de 2008 y julio de 2009 se seleccionó un total de 101 varones que acudieron a nuestra clínica junto a su pareja para un tratamiento de fertilidad. La edad media de éstos fue de 39 años. Los criterios de inclusión fueron: parejas con fallos repetidos de técnica de reproducción asistida, oligozoospermia (< 10 millones/ml) o astenozoospermia (< 50% a+b) y grados de fragmentación de ADN espermático, medido por TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling*), > 20%.

Este estudio fue aprobado por la comisión de ética y la dirección del centro donde se ha realizado.

A todos ellos se les propuso la toma de 2 sobres de Androferti®, cuya composición por sobre es L-carnitina fumarato 500 mg, coenzima Q-10 10 mg, zinc 5 mg, ácido fólico 100 µg, selenio 25 µg, vitamina B12 0,50 µg, vitamina C 30 mg, vitamina E 5 mg. También se les aconsejó acerca de hábitos de vida y alimenticios. Se les realizó un control con seminograma y valoración de la fragmentación de ADN de los espermatozoides a los 70 días de tratamiento. Las roturas del ADN espermático se estudiaron mediante la técnica de TUNEL usando el kit comercial *in situ cell death detection kit, fluorescein* (Roche, Mannheim, Alemania). Se basa en la incorporación de deoxiuridina marcada con componentes fluorescentes, gracias a la enzima Tdt, en los puntos de rotura de la cadena de ADN sencilla o doble en el extremo 3'-OH de la cadena afectada.

Dentro de los parámetros del seminograma se estudiaron los valores de concentración, movilidad, total móviles progresivos (TMP) y forma. El total de pacientes reclutados en la fase preliminar del estudio fue de 37, en el resto de los pacientes hubo 8 que obtuvieron embarazo espontáneo antes de finalizar el tiempo del control, el resto no acudió a consulta en el tiempo indicado. El resumen de datos obtenidos se contempla en la tabla 1.

TABLA 1. Resumen de los datos del seminograma

	Concentración	Movilidad (tipo A)	Movilidad (tipo B)	Movilidad (tipo C)	Movilidad (tipo D)	TMP	Formas
0 días	11,3	0	21	9	66	5,6	1,5
70 días	11	0	25	11	60	7,8	2

TMP: total móviles progresivos.

En la distribución de los datos, tras el control realizado a los 70 días, no se observan diferencias significativas. Por otro lado, la dispersión de los datos es bastante elevada en casi todas las variables. Para los valores centrales y dispersión de datos, en general, es mejor utilizar los resultados obtenidos por la mediana y por los cuartiles. En cuanto a la forma, y debido a los saltos de escala, sólo se podrán utilizar en el análisis ANOVA.

En el análisis descriptivo sí se observa un desplazamiento de la curva hacia la derecha en el caso de los espermatozoides tipo B y hacia la izquierda en los de tipo D, indicándonos una mejoría de la movilidad (figs. 1 y 2).

Los resultados de las correlaciones no son concluyentes, por lo que no se puede aplicar el análisis factorial y de componentes principales (fig. 3).

Los resultados de los análisis de las varianzas muestran que no hay diferencias significativas. Sin embargo, al ser el ANOVA dependiente de la distribución, no se recomienda, sólo la prueba de Wilcoxon (no paramétrica). Aunque las conclusiones son similares para la forma, no lo son para la variable concentración y TMP (figs. 4 y 5).

Aunque los datos no parecen significativos debido a la gran dispersión y al número de la muestra, sí parece haber de una manera genérica cierta tendencia a la mejoría de parámetros, como se puede observar de manera gráfica en la tabla de evolución individual de pacientes (figs. 6 y 7).

Con respecto a los datos de la fragmentación de ADN, la distribución de probabilidad de los datos inicialmente no se lleva a cabo de una forma normal, sin embargo, tras el control realizado se observa que hay

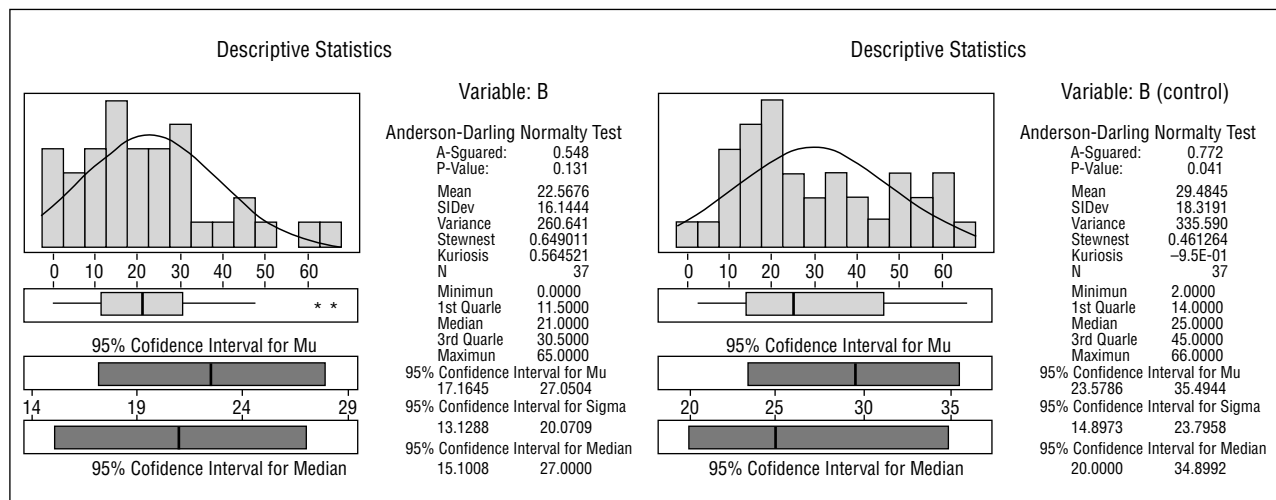


Figura 1. Análisis descriptivo. Espermatozoides tipo B base y tras tratamiento.

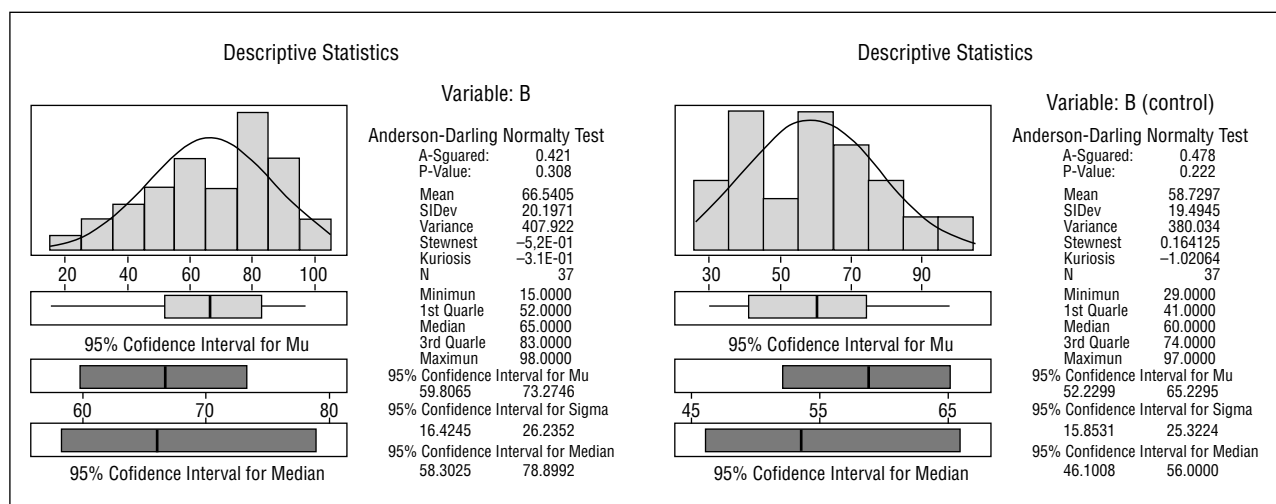


Figura 2. Análisis descriptivo. Espermatozoides tipo D base y tras tratamiento.

	Millones/ml	A	B	C	D
A	*				
B	0,249 0,137	*			
C	-0,054 0,749	*	0,352 0,033		
D	-0,186 0,269	*	-0,915 0,000	-0,682 0,000	
TMP	-0,721 0,000	*	0,647 0,000	0,110 0,518	-0,566 0,000

	Millones/ml	A	B	C	D
A	*				
B	0,065 0,701	*			
C	-0,032 0,851	*	-0,050 0,769		
D	-0,1049 0,774	*	-0,920 0,000	-0,345 0,036	
TMP	0,707 0,000	*	0,525 0,001	-0,125 0,462	-0,445 0,006

Figura 3. Correlaciones: millones/ml; A; B; C; D; TMP.

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	729	729	2.41	0.125
Error	72	21790	303		
Total	73	22519			

Individual 95% CIs For Mean Base on Pooled StDev					
Level	N	Mean	StDev		
Mill/ml	37	13.65	13.82	(.....+.....+.....+.....+.....)	
Mill/ml	37	19.92	20.35	(.....*.....)	
Pooled StDev =		17.40		10.0	15.0

Figura 4. One-way ANOVA: concentración; concentración (control).

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	1968	1968	2.20	0.142
Error	72	64305	893		
Total	73	66273			

Individual 95% CIs For Mean Base on Pooled StDev					
Level	N	Mean	StDev		
TMP	37	13.64	22.19	(.....*.....)	
TMP (con 37)	37	23.95	35.97	(.....*.....)	
Pooled StDev =		29.89		10	20

Figura 5. One-way ANOVA: TMP; TMP (control).

una tendencia a una distribución normal de los datos, siendo estadísticamente significativa (fig. 8).

Para los valores centrales y dispersión de datos, en general es mejor utilizar los resultados obtenidos por

la mediana y por los cuartiles al inicio del estudio y tras el control los valores de la media y de la desviación estándar.

Para ver si las diferencias existentes en las medianas son estadísticamente significativas es necesario ver el punto referente al ANOVA.

Los valores de la variable fragmentación de ADN tienen un rango de $31,7 \pm 9,5$ antes del tratamiento y de $22,4 \pm 19,1$ posterior al tratamiento, con una p (Wilcoxon) = 0,004.

El estudio ANOVA, los datos nos muestran que hay diferencias significativas entre los valores al inicio y el control (tabla 2).

DISCUSIÓN

Desde hace tiempo, el uso de antioxidantes de manera empírica se sabe que, en algunos casos, mejora la calidad espermática; sin embargo, no se sabía exactamente a qué varones podría beneficiar el uso de estos compuestos¹⁰. Está siendo mejor conocido el mecanismo del estrés oxidativo y, por tanto, su respuesta a los tratamientos que se propugnan para el control de los desequilibrios de éste¹¹.

Entre los efectos nocivos del desequilibrio del estrés oxidativo está la fragmentación de las cadenas de ADN de los espermatozoides, sobre todo la que se produce posttesticular en el epidídimo y los conductos seminíferos¹². La fragmentación de ADN espermático se puede traducir en fallos de implantación, alteraciones en el desarrollo embrionario o aumentos del número de abortos¹³. Por tanto, cualquier tratamiento o

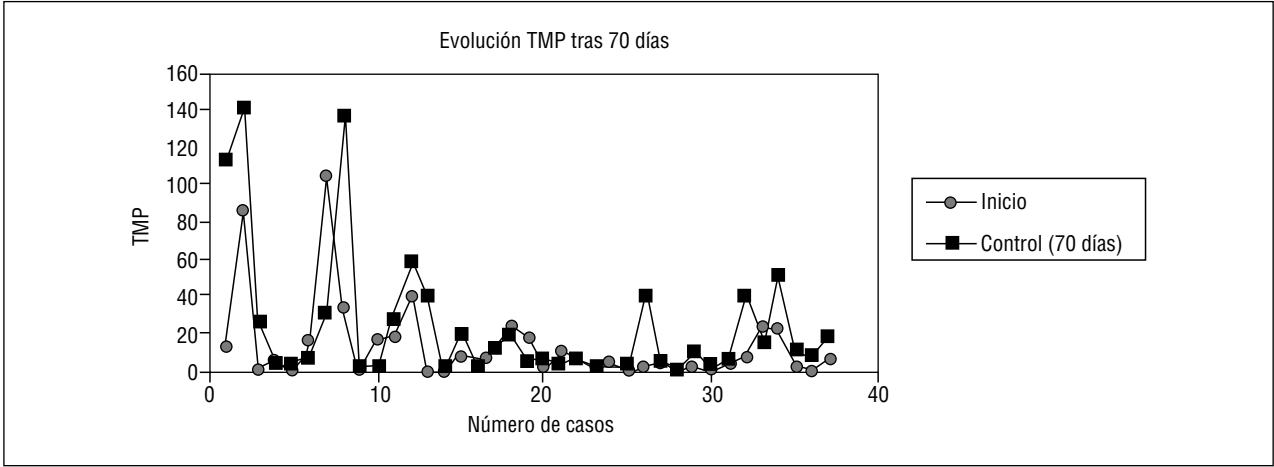


Figura 6. Evolución individual de cada paciente para TMP.

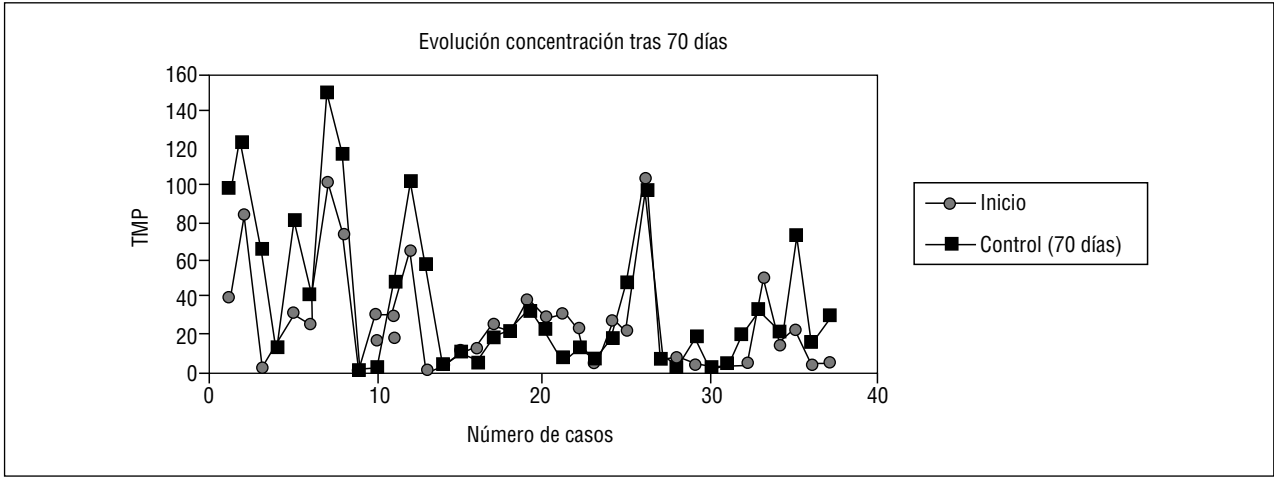


Figura 7. Evolución individual de cada paciente para concentración.

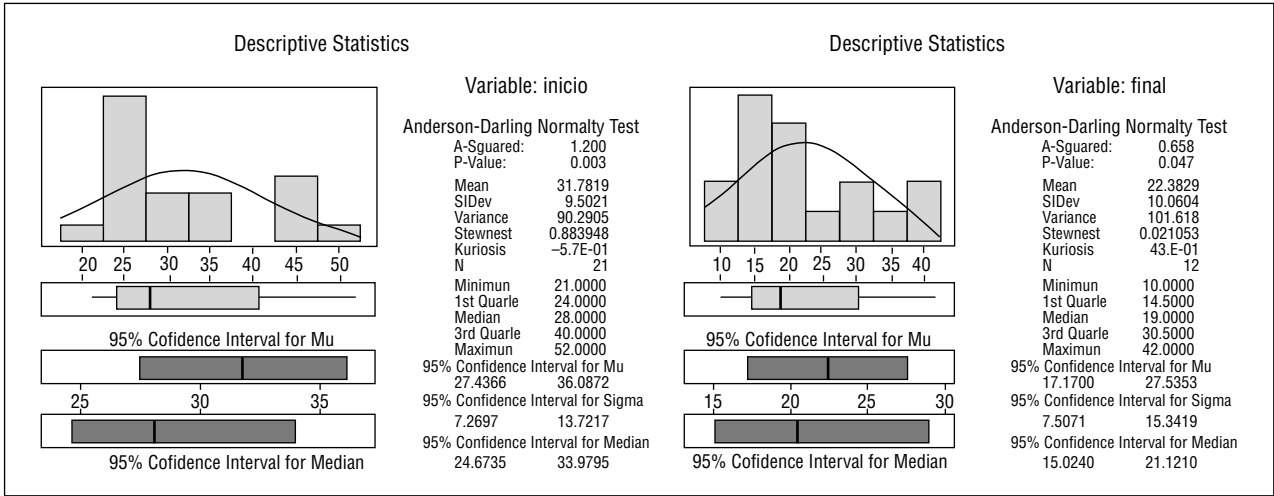


Figura 8. Análisis descriptivo de los valores de fragmentación de ADN.

TABLA 2. ANOVA de los datos de fragmentación de ADN

Pruebas no paramétricas. Estadísticos descriptivos					
	n	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Inicio	21	31,7619	9,50213	21,00	52,00
Final	17	22,3529	10,08056	10,00	42,00
Prueba de los rangos con signo Wilcoxon. Rangos					
		n	Rango promedio	Suma de rangos	
Final-inicio	Rangos negativos	13 ^a	10,5	136,5	
	Rangos positivos	4 ^b	4,13	16,5	
	Empates	0 ^c			
	Total	17			
ªFinal < inicio. ºFinal > inicio. ºFinal = inicio.					
Final-inicio					
Z		-2,843ª			
Sig. asintót. (bilateral)		0,004ª			

^aFinal < inicio. ^bFinal > inicio. ^cFinal = inicio.

^aBasado en los rangos positivos.

^bPrueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

hábitos de vida encaminados a reducir la fragmentación del ADN espermático se verá reflejado en mayores tasas de fertilidad¹⁴. Parece claro que el uso de antioxidantes puede ser beneficioso para corregir los defectos del ADN espermático¹⁵.

El uso de sustancias como las vitaminas C y E, el zinc, el ácido fólico, el selenio, la coenzima Q-10, la L-carnitina han demostrado su eficacia en diferentes estudios, algunos en toma individual, otros asociados, pero nunca en un asociación de todos los componentes¹⁶⁻¹⁸.

El tiempo de la duración total de la espermatogénesis es de unos 65-70 días¹⁹, por lo que el uso durante ese tiempo a nivel testicular sería el óptimo, pero esos espermatozoides no serían los que obtenemos en el eyaculado a los 2 meses. Los espermatozoides que valoramos en 70 días son espermatozoides extratesticulares que se están madurando, capacitando, almacenando o concentrando en las vías seminales, sobre todo en el epidídimo²⁰. Por tanto, si el tratamiento ya ha conseguido mejorar la fragmentación de ADN de los espermatozoides en esta zona, su uso durante un período más prolongado, unos 6 meses, nos permitirá valorar hasta qué punto se pueden mejorar los índices de fragmentación del ADN en el proceso completo, desde la espermiogénesis intratesticular hasta la eyaculación de los espermatozoides pasando por la capacitación epididimaria. Este punto es objeto en la continuación del estudio.

Cabe destacar que, si bien en estos datos preliminares el número de la muestra no es alto y hay una gran dispersión de datos en cuanto a los parámetros del se-

minograma, sí es interesante que la TMP y la concentración aumenten en tan sólo 70 días, ya que como antes explicamos estamos hablando de espermatozoides extratesticulares. Si analizamos a los pacientes pasados más días valoraremos también el efecto del tratamiento sobre la concentración y la TMP desde la célula madre intratesticular hasta el espermatozoide eyaculado.

Utilizamos la técnica TUNEL para la medición de la fragmentación de ADN espermático, porque creemos que es más exacta que otras técnicas ya que no tiene dependencia del observador, nos mide daño real y tiene un alto valor predictivo en reproducción asistida. Nuestro punto de corte fue considerar anormales muestras de fragmentación > 20%.

CONCLUSIONES

Los resultados preliminares del estudio demuestran que Androferti® es un buen complejo de elementos esenciales necesarios en el proceso de la formación y maduración espermática así como en el mantenimiento de su calidad hasta el momento del eyaculado. La mejoría de la fragmentación del ADN de los espermatozoides es clave, según todos los estudios actuales, para lograr mayores tasas de éxito en reproducción asistida, por lo que un tratamiento con un producto que logre esa mejoría, como el estudiado aquí, puede ser de gran utilidad en este campo.

La continuidad del estudio permitirá demostrar si Androferti® es también efectivo para mejorar otros parámetros, como: calidad embrionaria, disminución de los fallos de implantación, etc.

No obstante se hacen necesarios estudios bien diseñados, aleatorizados sobre todo este tipo de sustancias para avalar de una manera más científica lo que en la práctica clínica evidenciamos como un tratamiento útil.

Bibliografía

1. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril*. 2002;77:873-82.
2. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1,000 men of known fertility and in 1,000 cases of infertility marriage. *J Urol*. 1951;66:436-49.
3. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol*. 1994;152:107-10.
4. Garrido N, Meseguer M, Simón C, Pellicer A, Remohi A. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl*. 2004;6:59-65.
5. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2000;15:1338-44.

6. Arabi M, Mosthagi H. Influence of cigarette smoking on spermatozoa via seminal plasma. *Andrologia*. 2005;37:119-24.
7. Raastand T, Bjoro T, Hallen J. Hormonal responses to high and moderate intensity strength exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2001;82:121-8.
8. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A Jr. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod*. 1999;14:2801-7.
9. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol*. 2009;16:449-57.
10. Kumar R, Gautam G, Gupta P. Drug therapy for idiopathic male infertility: rationale versus evidence. *J Urol*. 2006;176: 1307-12.
11. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Hum Repro Update*. 2008;14;243-58.
12. Álvarez JG. Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Rev Int Androl*. 2007;5:354-63.
13. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl*. 2003;49:49-55.
14. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol*. 2009;16:449-57.
15. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl*. 2005;26:349-53.
16. Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoastheozoospermia with high dose vitamin C and E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum Reprod*. 1999;14:1028-33.
17. Young SS, Eskenazi B, Marchetti FM, Block G, Wyrobek AJ. The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. *Hum Reprod*. 2008;23:1014-22.
18. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl*. 2003;49:83-94.
19. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*. 1999;112:35-51.
20. Arrondo JL, Pomerol LM. Recuerdo anatomofisiológico del testículo y vía seminal. En: Pomerol Monseny JM, Arrondo Arrondo JL. editores. *Práctica andrológica*. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas S.A.; 1994. p. 3-13.