

ORIGINAL

Efecto del tratamiento con vitaminas, L-carnitina y coenzima Q₁₀ en el índice de vacuolización y la fragmentación espermática en pacientes de fecundación *in vitro*

Gemma López Granollers^{a,*}, Rafael Lafuente Varea^a, Miguel A. Checa Vizcaíno^{a,b}, Ana Monqaut^a y Mario Brassesco Macazzaga^a

^aCentro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH), Barcelona, España

^bDepartamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitari del Mar, Universitat Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 12 de septiembre de 2011; aceptado el 13 de octubre de 2011

PALABRAS CLAVE

Fragmentación de ADN;
Alta magnificación;
L-carnitina;
Coenzima Q₁₀;
Antioxidantes

Resumen

Objetivo: La aparición de nuevas herramientas de estudio en el campo de la andrología nos ha permitido evaluar nuevos marcadores de calidad seminal, como la presencia de vacuolas en el núcleo del espermatozoide, mediante el uso de microscopía de alta magnificación, y el grado de fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) espermático. Ambos marcadores de calidad pueden verse afectados por la presencia de radicales libres de oxígeno, que favorecen la oxidación celular. En el presente estudio piloto se plantea valorar la utilidad de un tratamiento con antioxidantes para reducir tanto el índice de vacuolización espermática, como el grado de fragmentación del ADN de una forma significativa.

Material y métodos: Estudio prospectivo para el que se seleccionó a un total de 65 pacientes, de los cuales 33 finalizaron el estudio. Cada paciente entregó dos muestras de semen y realizó un tratamiento con antioxidantes mediante Androferti®. Se evaluó el índice de vacuolización en el núcleo del espermatozoide y la fragmentación del ADN espermático en cada una de las muestras entregadas.

Resultados: Se observa un aumento estadísticamente significativo de espermatozoides con grados de vacuolización I y II después de un mes de tratamiento, así como también una disminución del grado de fragmentación del ADN espermático.

Conclusiones: A pesar de que se trata de un estudio clínico no aleatorizado, parece concluyente la importancia del uso de un tratamiento antioxidante para aumentar el éxito de un ciclo de reproducción asistida, con el objetivo de disminuir la influencia negativa de malformaciones en el núcleo espermático y de la fragmentación del ADN.

© 2011 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia

Correo electrónico: glopez@cirh.es (G. López Granollers).

KEYWORDS

DNA fragmentation;
High-magnification;
L-carnitine;
Coenzyme Q₁₀;
Antioxidants

Effect of a treatment with vitamins, L-carnitine and coenzyme Q₁₀ on sperm head vacuolization and DNA fragmentation on *in vitro* fertilization patients

Abstract

Objective: The appearance of new diagnostic tools in the field of andrology, have allowed the study of new sperm quality markers, such as the presence of vacuoles in the nucleus of the spermatozoa, by means of high magnification microscopy, and sperm DNA fragmentation. Both quality markers can be affected by the presence of free oxygen radicals that cause cellular oxidation. In the present pilot study we try to assess the utility of a therapy with antioxidants to significantly reduce both the sperm vacuolization grade and sperm DNA fragmentation.

Material and methods: In prospective study we included 65 patients, 33 of whom finished the study. Each patient brought two semen samples and underwent an antioxidant therapy with Androferti®. Sperm head vacuolization and DNA fragmentation were both assessed in each sample.

Results: It was observed a statistically significant increase of spermatozoa from grades I and II of vacuolization after one month of treatment. Also, sperm DNA fragmentation decreased after the treatment.

Conclusions: Although this is a non-randomized study, it seems conclusive the importance of an antioxidant therapy to increase assisted reproduction outcomes, aiming to minimize the negative influence of sperm nuclear malformations and sperm DNA fragmentation.

© 2011 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La detección de parámetros seminales con valor predictivo en el resultado de las técnicas de reproducción representa uno de los principales objetivos para los profesionales de un laboratorio de andrología. Si estos parámetros están alterados, hay que intentar disponer de los recursos necesarios para poder dar solución o intentar disminuir el efecto negativo.

Entre los parámetros básicos de valoración del espermograma, cabe destacar la importancia que ha adquirido la morfología espermática en el diagnóstico de la infertilidad masculina. A pesar de la controversia existente acerca de su función en la fecundación y el desarrollo embrionario¹, numerosos estudios han demostrado que la selección del mejor espermatozoide antes de una inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) mejora el resultado del tratamiento²⁻⁴.

La aparición de nuevas herramientas, como el microscopio de alta magnificación, ha permitido a los investigadores profundizar en el estudio de la morfología espermática y detectar defectos en el núcleo del espermatozoide, como la presencia de vacuolas nucleares que no pueden ser detectadas mediante una ICSI convencional a $\times 400$. Se ha demostrado que estas vacuolas tienen un efecto directo en el desarrollo embrionario y el aborto temprano^{5,6}. Varios autores han demostrado una correlación negativa entre la presencia de grandes vacuolas en el núcleo del espermatozoide y la estabilidad de la cromatina espermática^{4,7,8}. Asimismo, se ha observado también que el aumento de la fragmenta-

ción del ácido desoxirribonucleico (ADN) espermático está asociado a la presencia de anomalías en la morfología espermática⁹.

Los mecanismos exactos que dan lugar a estas alteraciones espermáticas son todavía objeto de estudio. Se han barajado diferentes teorías que implican la interrelación de diferentes mecanismos: empaquetamiento de la cromatina espermática, apoptosis, estrés oxidativo, anomalías genéticas y estrés crónico¹⁰. Un ambiente testicular alterado (con presencia de leucocitos, células germinales inmaduras, etc.) puede causar disfunción en la espermogénesis. Así pues, el daño en el ADN y el potencial de fertilidad espermático se han relacionado con la toxicidad provocada por el oxígeno y la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*)¹¹. Una elevada producción de ROS que sobrepase los mecanismos de defensa de la célula puede dañar significativamente la función de la membrana espermática debido a la peroxidación lipídica¹², con lo que así se reduce la capacidad del espermatozoide para llevar a cabo la reacción acrosómica¹³.

Debido a la escasa efectividad de los mecanismos endógenos de defensa en humanos, parece efectiva la administración de un tratamiento con antioxidantes^{11,14} para la mejora de la calidad espermática en pacientes que se someten a tratamiento de fertilización *in vitro*/ICSI.

El objetivo de este estudio piloto fue investigar el efecto de la L-carnitina, la coenzima Q₁₀ y las vitaminas C, E y B₁₂ en la vacuolización en la cabeza del espermatozoide y la fragmentación del ADN espermático.

Material y método

Para este estudio prospectivo se seleccionó a un total de 65 pacientes que acudieron a nuestro centro entre mayo y noviembre de 2009, de los cuales 33 finalizaron el estudio dentro de este período. La edad media \pm desviación estándar fue de $37,2 \pm 5,4$ años. El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético del centro y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

Cada paciente entregó dos muestras de semen en un intervalo aproximado de 30 días. Las muestras se obtuvieron por masturbación después de mantener entre 3 y 5 días de abstinencia sexual. Las muestras se dejaron licuar a temperatura ambiente y tras 20 minutos se realizó un análisis de los parámetros seminales básicos siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Se consideraron las variables siguientes: volumen (ml), concentración espermática ($n \times 10^6/ml$), movilidad espermática (porcentaje de espermatozoides a y b) y morfología espermática (porcentaje de formas normales).

Una vez entregada la primera muestra, los pacientes empezaron un tratamiento con Androferti® (Laboratorios Q Pharma SL, Alicante [España]), cuya composición por dosis es de 750 mg de L-carnitina fumarato, 250 mg de acetil-L-carnitina, 10 mg de coenzima Q₁₀, 5 mg de cinc, 100 µg de ácido fólico, 25 µg de selenio, 0,50 µg de vitamina B₁₂, 30 mg de vitamina C y 5 mg de vitamina E.

La dosis administrada fue de un sobre cada 12 horas durante un mínimo de 30 días. Se decidió realizar el estudio con este intervalo de tiempo con la intención de valorar el efecto de este tratamiento en espermatozoides del mismo ciclo espermatogénico.

Tras este período, cada paciente entregó una segunda muestra de semen que fue nuevamente analizada.

A cada una de las muestras se practicaron, además, los análisis siguientes: a) índice de vacuolización en el núcleo del espermatozoide, y b) fragmentación del ADN espermático.

El análisis del índice de vacuolización se llevó a cabo mediante un microscopio invertido equipado con lentes Nornarski, que permite un grado de magnificación de $\times 8000$. En cada una de las muestras se analizaron 100 espermatozoides, que se clasificaron en cuatro categorías, teniendo en cuenta el número y el tamaño de las vacuolas que contiene su núcleo⁴ (fig. 1).

La fragmentación del ADN espermático se evaluó mediante el kit Halosperm (Halotech DNA SL, Madrid [España])¹⁵ siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó el porcentaje de fragmentación mediante la evaluación de 500 espermatozoides de cada muestra, con microscopía óptica a $\times 1000$. Se considera que el resultado del test de Halosperm tiene un valor predictivo negativo en el resultado de embarazo cuando más del 30% de los espermatozoides en la muestra en fresco presentan fragmentación del ADN¹⁵.

Como principales indicadores de éxito del tratamiento antioxidante, se consideraron la mejora en el índice de vacuolización y en la fragmentación del ADN espermático.

Las comparaciones entre las muestras de semen pretratamiento y postratamiento se llevaron a cabo mediante el test Wilcoxon para datos pareados, considerándose estadís-

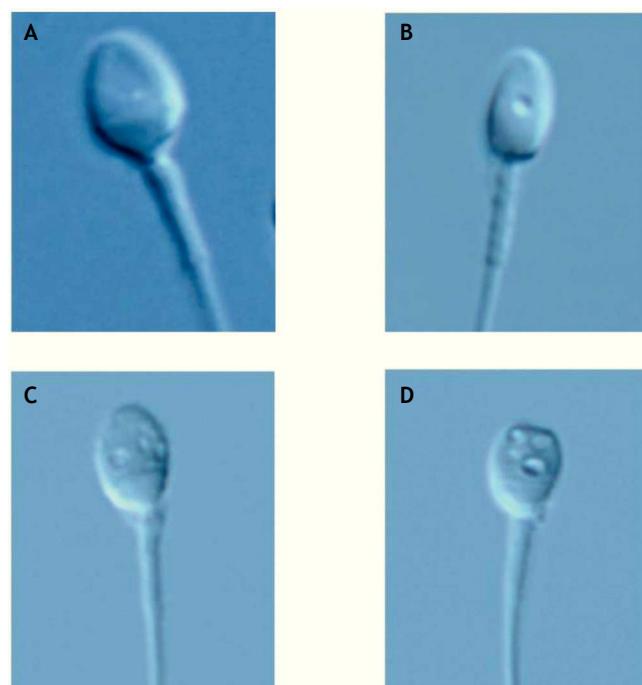


Figura 1 Criterio de clasificación de espermatozoides en función de la presencia vacuolar⁴. A) Forma normal sin vacuolas (grado I). B) Forma normal y un máximo de 2 vacuolas pequeñas (grado II). C) Forma normal y al menos una vacuola grande (grado III). D) Forma anormal u otras anomalías (grado IV). ($\times 8000$)

ticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Los datos se analizaron mediante software R v 2.9.0.

Resultados

Se observa un aumento estadísticamente significativo de espermatozoides con grados de vacuolización I y II después de un mes de tratamiento ($5,85 \pm 2,14$; $p = 0,01$). El grado de fragmentación del ADN espermático también se ve significativamente reducido después del tratamiento ($-4,91 \pm 2,5$; $p = 0,03$). En la tabla 1 se muestran las variaciones estadísticamente significativas expresadas como el incremento resultante de comparar las variables estudiadas antes y después de un mes de tratamiento antioxidante.

En la figura 2 se ilustran los valores de cada uno de los grados de vacuolización (grados I-IV) expresados como media \pm desviación estándar de la media.

En la figura 3 se ilustra la variación del porcentaje de espermatozoides de los grados I y II (considerados los más adecuados para IMSI [del inglés, *intra-cytoplasmic morphologically-selected sperm injection*, microinyección intracitoplasmática de esperma seleccionado morfológicamente])¹⁶ antes y después del tratamiento con antioxidantes.

En la figura 4 se representan los valores del índice de fragmentación del ADN espermático obtenidos antes y después del tratamiento.

Tabla 1 Resultado de la comparación de las diferentes variables estudiadas antes y después del tratamiento

	Antes	Después	Incremento ^a	Valor de p ^b
Vacuolización de grado I (%)	1,44 ± 0,32	3,48 ± 0,86	2,05 ± 0,79	0,007
Vacuolización de grado II (%)	16,7 ± 1,91	20,5 ± 1,91	3,81 ± 1,72	0,032
Vacuolización de grado III (%)	40,3 ± 2,1	42,85 ± 1,81	2,54 ± 2,93	0,339
Vacuolización de grado IV (%)	41,56 ± 3,41	33,16 ± 2,65	-8,4 ± 3,12	0,015
Vacuolización de grado I + II (%)	18,14 ± 2,15	23,99 ± 2,54	5,85 ± 2,14	0,019
Fragmentación de ADN (%)	27,62 ± 2,64	22,72 ± 1,71	-4,91 ± 2,5	0,033

ADN: ácido desoxirribonucleico.

^aValores expresados como media ± desviación estándar.

^bSe considera estadísticamente significativo cuando el valor de p es < 0,05.

Discusión

Hay varias hipótesis acerca del momento en el que se produce el daño oxidativo sobre los espermatozoides. Tesarik et al¹⁷ indicaron que había un mecanismo posttesticular de daño del ADN espermático, pero no excluyeron la posibilidad de una acción directa en el testículo durante el período de desarrollo de las células germinales.

Sabemos que el período de tratamiento escogido para el estudio no es suficiente para afectar un ciclo de espermato-

génesis completo, pero cabía esperar una mejora en la homeostasis y el microambiente del epidídimos¹⁴ que afectara directamente a los espermatozoides extratesticulares en período de maduración.

El tratamiento ofrecido a los pacientes contiene diferentes componentes que han sido comúnmente utilizados como tratamiento en varones con baja calidad espermática o infériles. Se ha demostrado que la carnitina tiene una acción en el metabolismo energético del espermatozoide y como protector del daño oxidativo, y que evita el deterioro de la

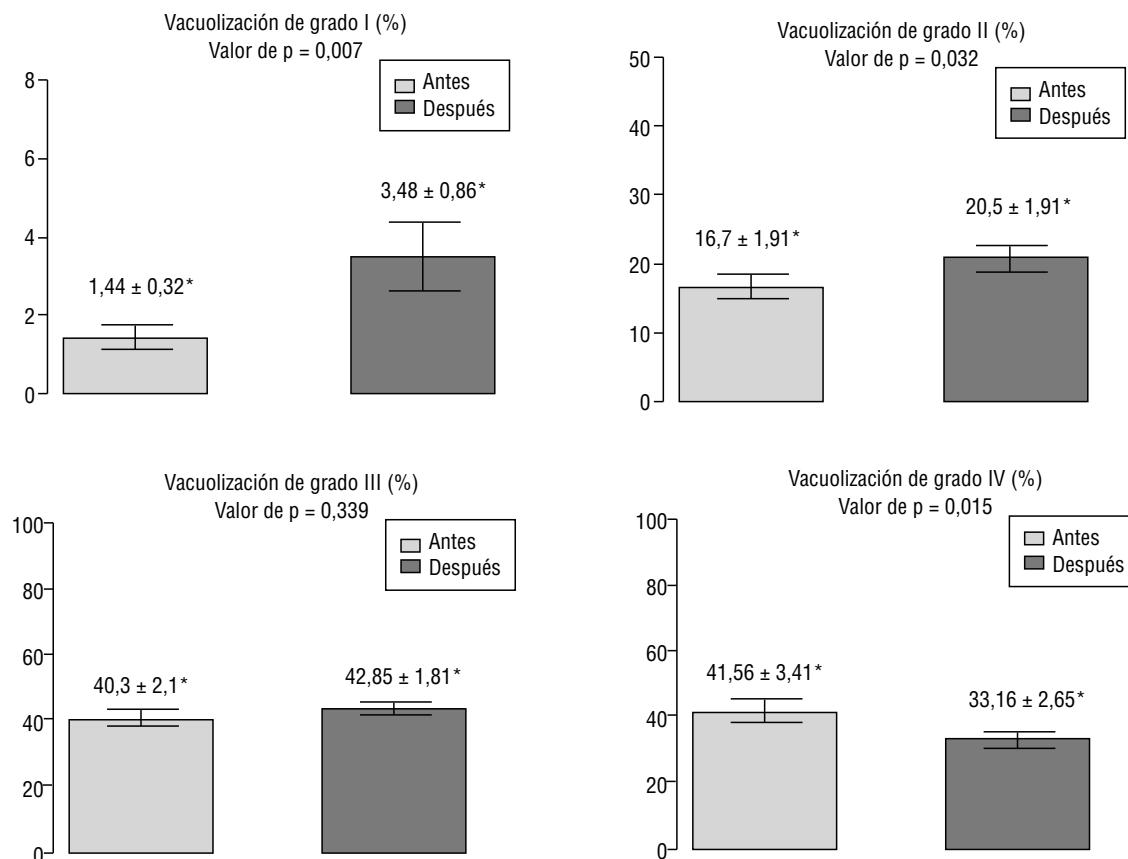


Figura 2 Comparación de los grados de vacuolización espermática (grado I, grado II, grado III y grado IV) evaluados mediante alta magnificación, antes y después del tratamiento con antioxidantes.

*Valores expresados como media ± desviación estándar.

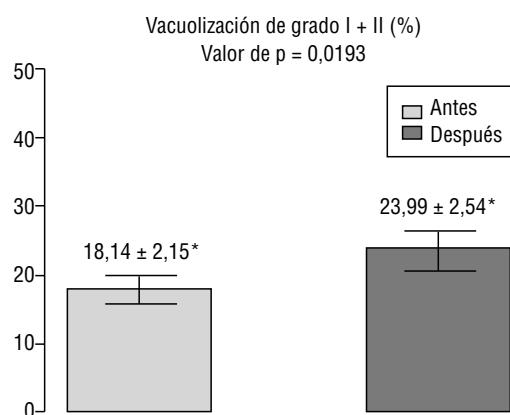


Figura 3 Comparación de la suma de los grados I y II de vacuolización espermática, considerados aptos para IMSI (del inglés *intra-cytoplasmic morphologically-selected sperm injection*, microinyección intracitoplásmica de esperma seleccionado morfológicamente), antes y después del tratamiento.

*Valores expresados como media ± desviación estándar.

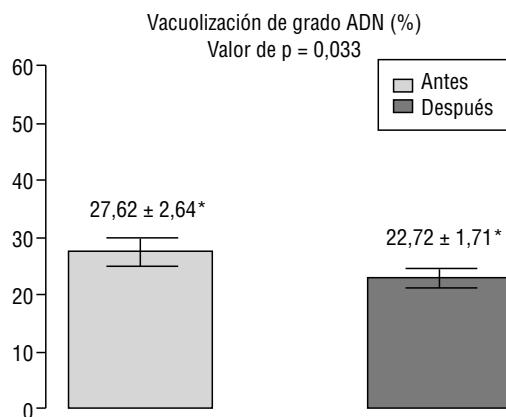


Figura 4 Comparación del índice de fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) espermático antes y después del tratamiento con antioxidantes.

*Valores expresados como media ± desviación estándar.

membrana espermática inducido por los radicales libres de oxígeno¹⁴. Se ha establecido también la función de la coenzima Q₁₀ como un componente de la cadena respiratoria mitocondrial, la cual desempeña un papel crucial en el metabolismo energético y como antioxidante liposoluble para membranas celulares y lipoproteínas. También se encuentran altos niveles de su forma reducida (ubiquinol) en los espermatozoides, hecho que indica un papel defensivo como antioxidante¹⁸.

Además, estudios previos han demostrado que el tratamiento con antioxidantes orales, como las vitaminas E y C, dan lugar a una disminución en la fragmentación del ADN espermático¹⁹.

Las variaciones de estos componentes en el plasma seminal o dentro de la célula se han correlacionado de forma positiva con una mejora en la integridad del ADN espermático. La contribución de estos componentes a la capacidad antioxidante del semen podría explicar el aumento de es-

permatozoides menos vacuolados en las muestras posttratamiento.

Dado que el resultado de las técnicas de reproducción asistida está influido negativamente por la presencia de malformaciones en el núcleo espermático y por la fragmentación del ADN espermático⁹ —y coincidiendo con el trabajo publicado por Balmori et al²⁰ en esta misma revista—, parece concluyente que el uso de un tratamiento antioxidante puede aumentar el éxito de un ciclo de reproducción asistida.

A pesar de que se trata de un estudio clínico no aleatorizado, los datos obtenidos muestran claramente que el índice de vacuolización y la fragmentación del ADN espermático se reducen notablemente gracias al tratamiento combinado de antioxidantes orales, como la L-carnitina, la coenzima Q₁₀ y las vitaminas C, E y B₁₂.

No obstante, consideramos la necesidad de llevar a cabo estudios prospectivos aleatorizados para concluir si el tratamiento con estos antioxidantes tiene también un efecto positivo en los parámetros seminales básicos y en la consecución de embarazo tras la aplicación de un tratamiento de reproducción asistida.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Antoni Miñarro (Departament d'Estadística de la Universitat de Barcelona) su colaboración en el análisis estadístico de los datos, así como al equipo de técnicos de laboratorio de andrología.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg AS, Bengtsson AC, Wiklund M. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology. *Hum Reprod*. 1996;11:1019-22.
2. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril*. 2003;80:1413-9.
3. De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2003;79:42-8.
4. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:617-27.
5. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod*. 2006;21:1787-90.
6. Cairó O, Prats L, Rovira F, Rodríguez M, Brassesco A, Del Rio F, et al. Magnificación de espermatozoides: una nueva visión del factor masculino en reproducción asistida. *Rev Int Androl*. 2010;8:89-93.

7. Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:42-5.
8. Junca AM, Cohen-Bacrie P, Belloc S, Dumont M, Menezo Y. Teratozoospermia at the time of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Gynecol Obstet Fertil*. 2009;37:552-7.
9. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*. 2003;18:1023-8.
10. Álvarez JG. Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Rev Int Androl*. 2007;5:354-63.
11. Geva E, Lessing JB, Lerner-Geva L, Amit A. Free radicals, anti-oxidants and human spermatozoa: clinical implications. *Hum Reprod*. 1998;13:1422-4.
12. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 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.
13. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl*. 1989;10:214-20.
14. Lenzi A, Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F, et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril*. 2003;79:292-300.
15. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005;84:833-42.
16. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, et al. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod*. 2005;20:185-90.
17. Tesarik J, Ubaldi F, Rienzi L, Martinez F, Iacobelli M, Mendoza C, et al. Caspase-dependent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis. *Hum Reprod*. 2004;19:254-61.
18. Balercia G, Buldughini E, Vignini A, Tiano L, Paggi F, Amoroso S, et al. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertil Steril*. 2009;91:1785-92.
19. 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.
20. Balmori C, Areces C, Pacheco A, San Celestino M, García JA. Impacto de un complejo de antioxidantes sobre la fragmentación del ADN espermático en varones infériles. *Rev Int Androl*. 2010;8:107-13.