



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

“DETERMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO HUMANO
CRIOPRESERVADO EN PACIENTES CON PROBLEMAS DE INFERTILIDAD EN POBLACIÓN
MEXICANA”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

NUBIA MONSERRAT SERRANO MACEDO

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Pedro Cuapio Padilla
Instituto Valenciano de Infertilidad México

ASESORA INTERNA

M en IBSH Angélica Flores Ramírez
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM



3 de Febrero del 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

- El presente trabajo se lo dedico a mis padres por su apoyo incondicional que contribuyo de manera esencial a la realización de una de mis metas.

AGRADECIMIENTOS

- A la M en IBSH Angélica Flores Ramírez por su apoyo constante e incondicional a lo largo del desarrollo de mi investigación.
- Gracias a IVI México por apoyar mi investigación y en particular al M. en C. Pedro Cuapio Padilla por su género tiempo en apoyo a la elaboración de mi trabajo de tesis, además a Luis Quezada por su ayuda en la parte práctica de mi trabajo.
- Al maestro Armando por su ayuda en la parte estadística de mi trabajo que fue parte esencial en esta investigación.
- Además les agradezco a todos los trabajadores del laboratorio de IVI México por todos sus comentarios que siempre fueron bien recibidos.
- Y finalmente, y no por ello menos importante a mis revisores de tesis por su enorme disponibilidad para la revisión de mi tesis.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
I. SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO	3
Estructuras funcionales del sistema reproductor masculino	3
a) Testículos	4
b) Sistema de conductos	5
c) Órganos accesorios	6
II. ESPERMATOGÉNESIS	7
a) Células germinales	7
b) Fases de la espermatogénesis	8
c) Factores hormonales que estimulan la espermatogénesis	10
d) Espermatozoides	11
III. EJE HIPOTÁLAMO HIPOFISIARIO- GONADA MASCULINA	11
IV. INFERTILIDAD MASCULINA	13
a) Etiología clínica de la infertilidad masculina	13
a.1) Varicocele	13
a.2) Infecciones de las glándulas accesorias masculinas	14
a.3) Factor genético	15
a.4) Factores inmunológicos	15
a.5) Factores endócrinos	15
a.6) Enfermedades sistémicas	16
a.7) Alteraciones nerviosas del eyaculado	16
a.8) Cáncer testicular	17
a.9) Gonadotoxinas	17
a.10) Infertilidad inexplicable	18
V. ESTUDIO BÁSICO DEL VARÓN INFÉRIL	18
a) Historia clínica	18
b) Evaluación andrológica	19
b.1) Examen físico integral	19
b.2) Espermiograma de infertilidad	19
b.2.1) Recolección de la muestra	20
b.2.2) Índice Macroscópico	20
b.2.3) Índice Microscópico	22
c) Valoración endócrina	25
d) Análisis bioquímico del plasma seminal	26
VI. CARACTERÍSTICAS DEL ADN	27

VII. FRAGMENTACIÓN DE ADN EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS	28
a) Calidad seminal y fragmentación de ADN espermático	28
b) Relación entre fragmentación del ADN en el espermatozoide y tasa de fertilización	29
c) ADN espermático y gestación natural	30
d) Lesión en el ADN espermático y fecundación in vitro (FIV)	30
e) Daño del ADN espermático e ICSI	31
f) Significación clínica del estudio de lesiones al ADN espermático	31
g) Relación entre fragmentación del ADN espermático y desarrollo embrionario	31
h) Relación entre fragmentación de ADN y edad	32
i) Fragmentación de ADN y criopreservación	33
j) Reducción de la fragmentación del ADN espermático	35
VIII. MECANISMOS DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LOS ESPERMATOZOIDES	36
1. Alteraciones durante el proceso de espermiogénesis	36
2. Inducción de apoptosis durante el proceso de espermiogénesis	37
3. Inducción del daño de ADN en espermatozoides diferenciados maduros por espermatozoides inmaduros que producen niveles elevados de radicales libres (ROS)	37
4. Activación de caspasa y endonucleasas	38
IX. MÉTODOS PARA DETERMINAR DE FRAGMENTACIÓN DE ADN	39
a) Test SCD	42
b) Test SCSSA	42
c) Ensayo TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling)	43
d) Cromomicina A3 (CMA3)	43
e) DBD-FISH (DNA Breakage Detection)	43
f) Ensayo del cometa	44
JUSTIFICACIÓN	45
HIPÓTESIS	46
OBJETIVOS GENERALES	46
OBJETIVO PARTICULAR	46
MATERIALES Y MÉTODOS	47
a) Colecta de la muestra	47
b) Seminograma	47
c) Congelación	48
d) Fragmentación de ADN	49
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	52
RESULTADOS	52
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	62
ABREVIATURAS	63
BIBLIOGRAFÍA	64



RESUMEN

La evaluación del daño del ADN en los espermatozoides es importante para considerar una alta eficiencia reproductiva. Los parámetros convencionales en el análisis de semen como la morfología, movilidad y concentración espermática son insuficientes para evaluar el potencial reproductivo del varón, por esta razón es importante que el análisis de la integridad del ADN se realice de manera complementaria al seminograma. Diversos estudios mencionan que la infertilidad afecta a casi un 20% de las parejas en edad reproductiva y en la mitad de los casos se asocia a factor masculino.

Un 15% de los casos de infertilidad son atribuibles a factor desconocido, una posible respuesta podría ser la integridad del ADN en los espermatozoides, ya que como se sabe la correcta transmisión de la información genética del espermatozoide al ovocito es esencial para el desarrollo embrionario y las roturas del ADN podrían conllevar a alteraciones en la fertilidad y por consiguiente en el desarrollo embrionario.

Por esta razón en el presente estudio se analizaron muestras de semen de pacientes infértiles que acuden por primera vez para la realización de algún procedimiento de reproducción asistida (grupo II), a estos se les realizó un seminograma, criopreservación de semen a -196°C y test de fragmentación.

Al grupo control (grupo I) se le realizó el mismo procesamiento de análisis que al grupo II y finalmente al grupo III solo se realizó el seminograma debido a que la baja concentración de espermatozoides móviles recuperados tras la descongelación eran insuficientes para realizar el estudio de fragmentación en el ADN de los espermatozoides, el cual requiere una concentración mínima de 5 millones/mililitro.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la fragmentación de ADN espermático del grupo II presenta mayor daño en comparación al grupo I con una $P= 0.001$ considerando significativo $P < 0.005$. Además en esta investigación no se encontró una relación en el caso de fragmentación con ADN con morfología; se presenta un aumento en las formas anormales con una $P= 0.152$.

Finalmente en este estudio no se presenta una correlación entre la etiología y la fragmentación de ADN en relación al grupo II, a pesar de ello se observa una tendencia de incremento del grado de fragmentación de ADN espermático dependiendo de la gravedad de la etiología.



INTRODUCCIÓN

El éxito de las técnicas de reproducción asistida (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 sus causas debería de ser analizado antes de iniciar el tratamiento (Álvarez, 2005).

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 (Muratori *et. al.*, 2003; Sakkas *et. al.*, 2002; Larson *et. al.*, 2000; Lopes *et. al.*, 1998). 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 Fecundación in vitro (FIV) o tras Inyección intra citoplasmática (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) (Morales *et. al.*, 2007).

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 costo socio-económico (Morales *et. al.*, 2007).

Parejas con infertilidad de causa ideopática o con abortos de repetición podrían beneficiarse con el test de fragmentación de ADN. Además también podría aplicarse a parejas de edad avanzada donde probablemente el factor combinado masculino (aumento en el grado de fragmentación de ADN en los espermatozoides) y femenino (disminución de la capacidad reproductora del ovocito) podrían contribuir de manera importante a las causas de infertilidad de la pareja. También podría aplicarse a parejas con infertilidad por factor masculino y fallo repetido de embarazo con TRA, aún cuando la cantidad de ovocitos sea buena (ovocito de donantes o de mujeres de parejas de infertilidad con edades inferiores a los 30 años), ya que ovocitos de alta calidad citoplasmática y genómica serían capaces de reparar un grado elevado de fragmentación de ADN de los espermatozoides. Ovocitos inmaduros u ovocitos cuyo mecanismos de reparación no funcionen de forma adecuada (por ejemplo en mujeres de edad avanzada) o que hayan sido dañados por factores tóxicos endógenos (por ejemplo, radicales libres) o exógenos (radiación, tóxicos ambientales) no serían capaces de reparar ese daño (Álvarez, 2005).

Experimentalmente se ha observado que la fertilización del ovocito en metafase II por espermatozoides con daño de ADN podría conducir a alteraciones en el desarrollo del embrión, fallo en la implantación con aumento en la tasa de aborto (Everson *et. al.*; 1999; Twigg *et. al.*, 1998b; Parinaud *et. al.*, 1993; Genesca, 1992).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se pretende realizar un estudio para determinar el grado de fragmentación de ADN de los espermatozoides en pacientes de 1ª vez de consulta que presentan infertilidad, previo a cualquier procedimiento de Reproducción Asistida, así como determinar si el grado de la fragmentación de ADN se correlaciona con la morfología del espermatozoide y con la etiología del paciente. Con ello, se intenta profundizar en el conocimiento que permita una mayor probabilidad de embarazo.



MARCO TEÓRICO

I. SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO.

La reproducción en el varón es una función integrada dependiente de la interacción de señales hormonales y nerviosas entre el sistema nervioso central, el hipotálamo, la hipófisis y el testículo (Tresguerres, 1999).

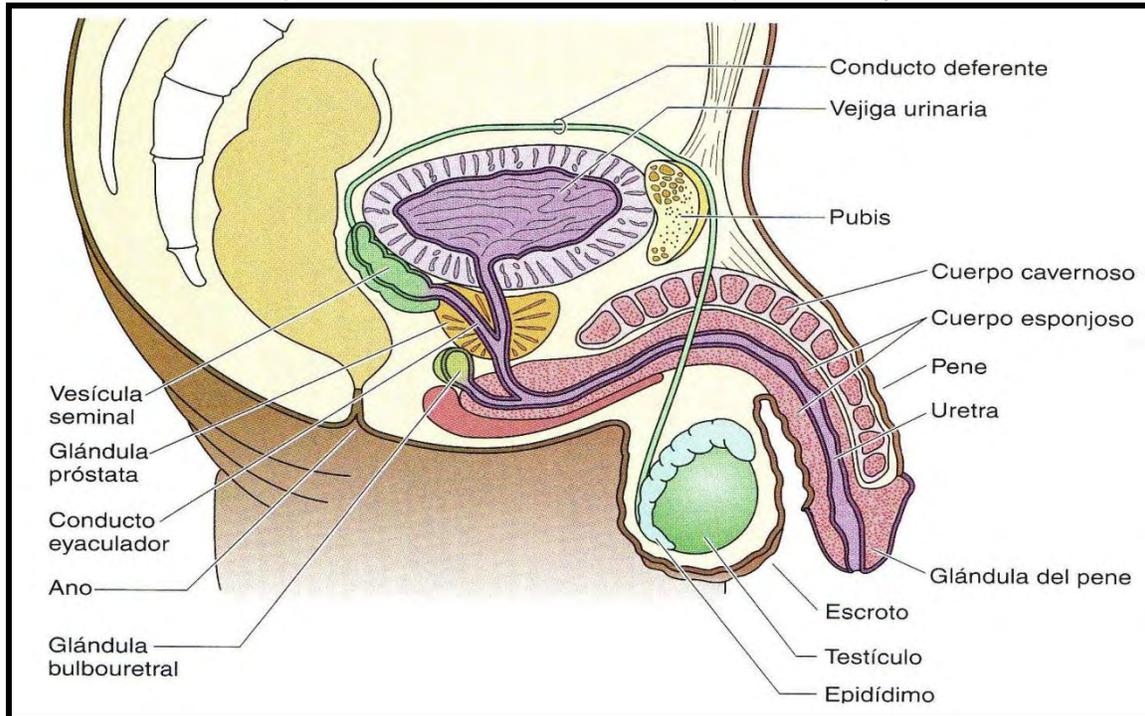
Los testículos producen y liberan células germinales (*espermatogénesis*) y sintetiza hormonas esteroideas (*esteroidogenesis*) y peptídicas, Estas dos actividades se realizan en compartimentos diferentes, la espermatogénesis en los túbulos seminíferos y la esteroidogénesis en las células de Leydig del intersticio. Ambas funciones están reguladas desde el punto de vista endocrino por el sistema hipotálamo-hipófisis anterior. Aunque existe una estrecha relación entre la biosíntesis de esteroideos y la espermatogénesis, estas dos funciones pueden tener lugar de forma independiente; puede mantenerse la producción de andrógenos después de desaparecer del epitelio germinal y, en ciertas situaciones experimentales, si hay andrógenos presentes, puede existir espermatogénesis sin que las células de Leydig no funcionen (Tresguerres, 1999).

El testículo está compuesto hasta de 900 túbulos seminíferos en espiral cada uno de más de 0.5 metros de longitud, en los que se forman los espermatozoides. Los espermatozoides se vacían después al epidídimo, otro tubo en espiral de unos 6 metros de longitud. El epidídimo se continúa con en el conducto deferente inmediatamente antes de que el conducto penetre en el cuerpo de la glándula prostática. Dos vesículas seminales, localizadas una en cada lado de la próstata, se vacían en el extremo prostático de la ampolla, y el contenido de la ampolla y de las vesículas seminales pasa al conducto eyaculador que atraviesa el cuerpo de la glándula prostática para desembocar en la uretra interna. Los conductos prostáticos de la glándula prostática se vacían a su vez, en el conducto eyaculador. Finalmente, la uretra es el último eslabón de la comunicación entre el testículo y el exterior. La uretra está provista de moco derivado de numerosas glándulas uretrales localizadas en toda su longitud y todavía en mayor cantidad de las glándulas bulbouretrales (Glándulas de Cowper) localizadas cerca del origen de la uretra (Guyton, 2001).

Estructuras funcionales del sistema reproductor masculino

El sistema reproductor masculino esta formado por las gónadas (dos testículos), los conductos excretores (epidídimo, conducto deferente y eyaculador) y varias estructuras accesorias (próstata, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y pene) (Figura 1; Tresguerres, 1999).

Figura 1. Aparato reproductor masculino (Gartner, 2002).



a) Testículos

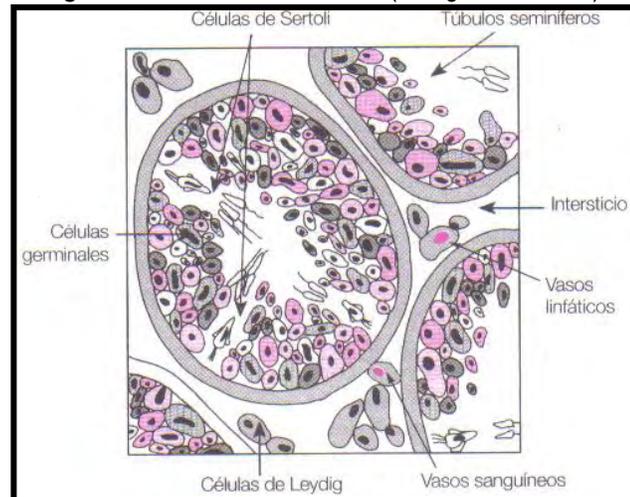
Los testículos humanos están suspendidos en el escroto, manteniéndose fuera de la cavidad abdominal, ya que para que se lleve a cabo la espermatogénesis de manera normal la temperatura testicular debe estar 2-4 °C por debajo de la temperatura corporal. Si no se lleva a cabo el descenso de los testículos (criptorquidia) se produce esterilidad porque se inhibe la espermatogénesis, mientras que la esteroidogénesis se mantiene. El escroto desempeña un importante papel en la regulación térmica del testículo; por mecanismos de reflejo el músculo dartos regula la distancia entre el testículo y la ingle contrayéndose cuando el ambiente es frío y relajándose cuando es caliente. Esta disminución en la temperatura depende además del plexo pampiniforme, que actúa como intercambiador de calor en contracorriente entre el sistema arterial y venoso (Guyton, 2001).

Cada testículo humano adulto es un cuerpo ovoide de 3-5 cm y un diámetro de 1.5 a 3 cm, y aunque muestran un patrón sumamente complejo e irregular de circunvalaciones, sus dos extremos terminan en una serie de cadenas o *red testicular*. Los túbulos seminíferos están formados por un epitelio poliestratificado; en el epitelio se encuentran dos tipos celulares, células germinales en distintos estadios madurativos y células de Sertoli. Los espermatozoides, que son las células germinales maduras, son liberadas a la luz del túbulo junto con un líquido acuoso, segregado por los túbulos que los transportan hasta el epidídimo, las células de Sertoli son de gran tamaño y están adosadas a la capa más interna de la membrana basal, desde donde se extienden radialmente hasta la luz de los túbulos, su citoplasma forma prolongaciones que rodean las células germinales (Tresguerres, 1999).

Entre las células de Sertoli existen unas uniones estrechas, formando la barrera hematotesticular, que se desarrolla durante la pubertad, justo antes de que se inicie la espermatogénesis, y divide el epitelio germinal en un compartimento basal (que contiene las células germinales inmaduras) y otro adluminal (que contiene las células germinales más maduras). Esta barrera hematotesticular aísla las células germinales, evitando la difusión de autoantígenos del interior del túbulo a los vasos sanguíneos. Las células de Sertoli, durante el periodo de vida fetal secretan un factor inhibidor de los conductos de Müller (Hormona Antimülleriana o AMH) que bloquea el desarrollo del útero y las trompas uterinas; en la edad adulta tienen un papel nutritivo, agocitario y sintetizan una gran cantidad de sustancias directamente relacionadas con la función reproductora. La pared que rodea a los túbulos o a la lámina propia está formada por una membrana basal continua, rodeada por varias capas de células meoides y matriz extracelular. Las células meoides, además de ser las responsables de la función contráctil del túbulo que propulsa los espermatozoides no móviles hasta la red testicular, parecen intervenir en la regulación paracrina del testículo (Tresguerres, 1999).

El tejido intersticial, que representa aproximadamente el 15% del volumen testicular total contiene todos los vasos sanguíneos y linfáticos, y pequeños nervios no mielizados, también contiene células de Leydig, fibroblastos, macrófagos y células cebadas (Figura 2; Tresguerres, 1999).

Figura 2. Túbulos seminíferos (Tresguerres, 1999).



b) Sistema de conductos

El sistema de conductos está formado por el epidídimo, el conducto deferente y el conducto eyaculador. La red testicular está unida al epidídimo por los conductos eferentes. En el hombre y debido a la escasa distancia que existe entre el testículo y el epidídimo, los conductos eferentes son relativamente cortos y su número es de 5-6. El epidídimo es un tubo plegado que termina en el conducto deferente; se divide en cuatro partes denominadas segmento inicial, cabeza, cuerpo y cola. Una subdivisión alternativa, basada en criterios morfológicos y funcionales, lo divide en tres segmentos (inicial, medio y terminal); los segmentos iniciales y medio intervienen en el proceso de maduración del espermatozoide, mientras que el terminal sirve de almacén para los espermatozoides maduros hasta la eyaculación. El conducto deferente, que en el ser humano tiene



unos 25 cm de longitud, asciende por el borde posterior del testículo y penetra en la cavidad pélvica por el conducto inguinal. No puede ser considerado como un simple conducto, ya que su complejo epitelio tiene funciones secretoras y absorptivas; en su porción terminal se forma un ensanchamiento o ampolla que sirve de almacén de espermatozoides. El conducto eyaculador se inicia en la unión del deferente con la vesícula seminal, atraviesa la próstata y desemboca en la uretra (Tresguerres, 1999).

c) Órganos accesorios.

Función de las vesículas seminales

Cada vesícula seminal es un túbulo tortuoso, lobulado, revestido por un epitelio secretor de un material mucoso rico en fructosa, ácido cítrico y otras sustancias nutritivas, así como grandes cantidades de prostaglandina y fibrinógeno. Durante el proceso de emisión y eyaculación, cada vesícula seminal vacía su contenido al conducto eyaculador poco tiempo después de que el conducto deferente vacíe los espermatozoides. Esto aumenta notablemente el volumen de semen eyaculado y la fructosa y otras sustancias del líquido seminal tienen un considerable valor nutritivo por los espermatozoides eyaculados hasta que uno de ellos fecunda el óvulo (Tresguerres, 1999).

Se cree que la prostaglandina (PGE2, PGE1) ayuda de dos maneras a la fecundación: a) reaccionando con el moco cervical femenino para hacerlo más receptivo al movimiento de los espermatozoides, y b) posiblemente desencadenando contracciones peristálticas invertidas del útero y de las trompas de falopio para mover los espermatozoides hacia los ovarios (unos pocos espermatozoides alcanzan el extremo superior de las trompas de falopio en 5 minutos) (Guyton, 2001).

Función de la glándula prostática

La glándula prostática secreta un líquido poco denso, lechoso, que contiene iones citrato, calcio, fosfato, una enzima de coagulación y una proteasa. Durante la emisión, la cápsula de la glándula prostática se contrae simultáneamente con las contracciones del conducto deferente, de forma que el líquido poco denso, lechoso, de la glándula prostática contribuye aún más al volumen de semen. El carácter ligeramente alcalino del líquido prostático es importante para el éxito de la fecundación del óvulo, pues el líquido del conducto deferente es relativamente ácido por la presencia del ácido cítrico y de los productos finales del metabolismo de los espermatozoides y en consecuencia ayudan a inhibir la fertilidad de los espermatozoides. Además, las secreciones vaginales de la mujer son ácidas (pH de 3.5 a 4). Los espermatozoides no alcanzan una motilidad óptima hasta que el pH del líquido que los baña se eleve de 6.0 a 6.5. En consecuencia, es probable que el líquido prostático, ligeramente alcalino, ayude a neutralizar la acidez de estos otros líquidos tras la eyaculación facilitando la movilidad y fertilidad de los espermatozoides (Guyton, 2001).

Función de las glándulas bulbouretrales

Las glándulas bulbouretrales, también llamadas glándulas de Cowper, secretan en la uretra un líquido alcalino, mucoso, con un alto contenido en ácido siálico, que lubrica sus paredes justo antes de que llegue el eyaculado (Guyton, 2001).

Pene

El pene es un órgano genital externo, eréctil, altamente vascularizado, que permite el depósito de los espermatozoides en el conducto vaginal femenino (Guyton, 2001).

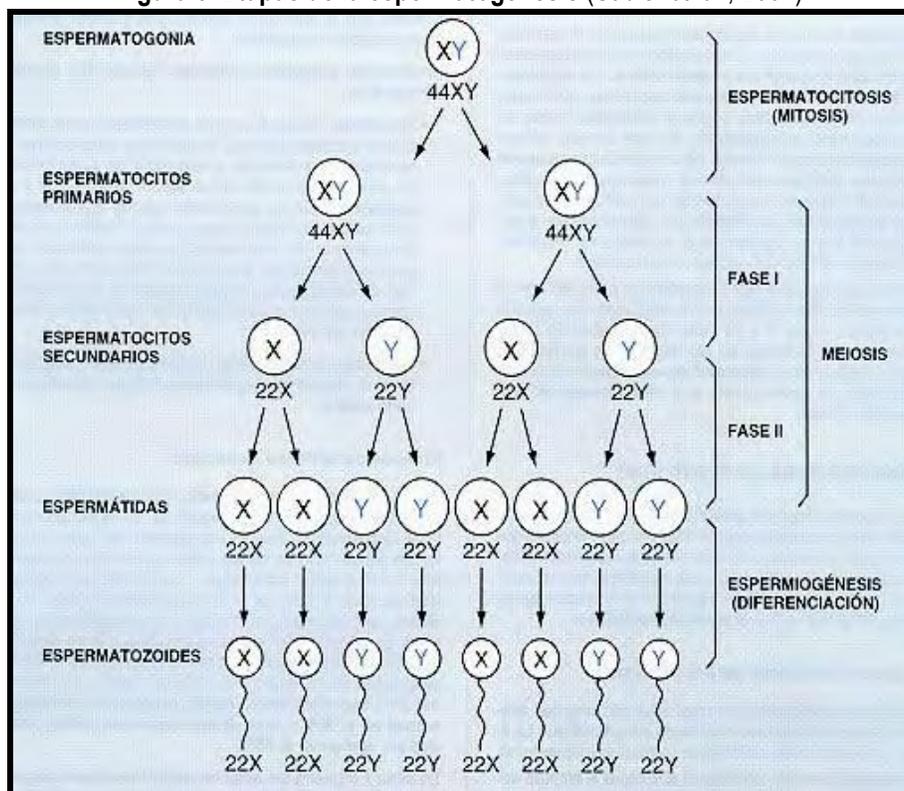
II. ESPERMATOGÉNESIS

a) Células germinales

La espermatogénesis es la secuencia de acontecimientos citológicos mediante los cuales las células germinales inmaduras o espermatogonias se transforman en células germinales maduras o espermatozoides (Figura 3; Sadler *et. al.*, 2004; Guyton, 2001; Tresguerres, 1999).

La espermatogénesis es un proceso continuo en el que se distinguen tres fases. La primera es una fase de replicación celular o mitosis, la segunda de división reduccional o meiosis, y la tercera de diferenciación celular o espermiogénesis. La primera fase se realiza en el compartimiento basal de los túbulos seminíferos y la segunda y tercera en el compartimiento adluminal. En el hombre se inicia en la pubertad y se mantiene durante toda la vida con una ligera disminución durante la senectud; tiene una duración aproximada de 74 días y se lleva a cabo en el testículo (64 días) y en el epidídimo (10 días, donde el espermatozoide adquiere movilidad independiente y las enzimas necesarias para la penetración en el ovocito). Cada 2 a 3 semanas, y antes de que se completen los ciclos anteriores, se inicia un nuevo ciclo (Tresguerres, 1999).

Figura 3. Etapas de la espermatogénesis (Sadler *et. al.*, 2004).





b) Fases de la espermatogénesis

1ª. Fase

La proliferación por mitosis de las espermatogonias tiene un doble fin: por una parte, obtener espermatocitos primarios; por la otra, mantener el número de espermatogonias. Los túbulos contienen gran cantidad de células pequeñas y medianas denominadas espermatogonias, las que forman dos o tres capas en la zona más externa del epitelio tubular. Durante la espermatogénesis, las espermatogonias que inician su diferenciación sufren una evolución unidireccional e irreversible y dan lugar a distintos tipos de espermatogonias en distintos estadios madurativos y morfológicamente definibles, llamadas A oscuras, A claras y B (Tresguerres, 1999).

2ª. Fase

Cuando la espermatogonia entra en meiosis se le denomina espermatocito primario. En el proceso meiótico hay dos divisiones celulares. Mediante la primera división meiótica los espermatocitos primarios (número diploide de cromosomas) dan lugar a dos espermatocitos secundarios (número haploide, uno con el cromosoma sexual X y otro con Y). Por la segunda división meiótica los dos espermatocitos secundarios dan lugar a cuatro espermátides. Las espermátides son pequeñas, redondeadas e indiferenciadas y se encuentran localizadas cerca de la luz del túbulo (Tresguerres, 1999).

3ª. Fase

También llamada espermiogénesis, durante la cual no se producen más divisiones, sino una serie de cambios nucleares y citoplasmáticos que conducen a la transformación de una célula convencional en un espermatozoide completamente diferenciado, con una estructura flagelar. Estas transformaciones consisten en la condensación y elongación del núcleo que se dirige a la periferia de la célula, formación del acrosoma por fusión de vesículas del complejo de golgi, formación de un flagelo con microtúbulos y mitocondrias y pérdida de citoplasma, que se queda como cuerpo residual en los túbulos (Tresguerres, 1999).

Dentro del túbulo seminífero los diferentes tipos de células germinales se disponen en asociaciones celulares bien definidas denominadas estadios del epitelio seminífero. Su organización espacial se denomina onda espermatogénica y el conjunto de estadios constituye el ciclo espermatogénico (Tresguerres, 1999).

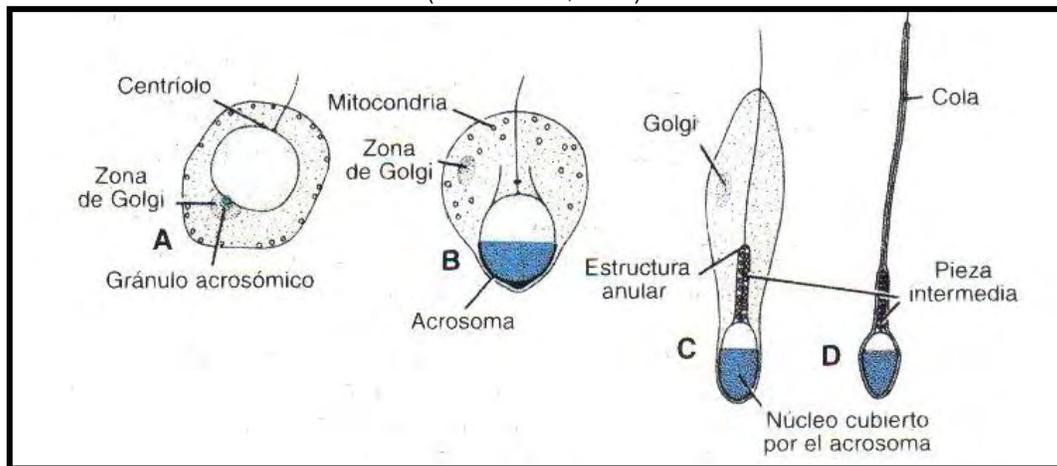
A partir de cada espermatogonia se producen cuatro espermatocitos haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos y a la vez están en comunicación con la célula nutricia o de Sertoli; estas últimas, a partir de moléculas señalizadoras, inducen el proceso denominado espermiogénesis o metamorfosis que convierte las espermátides en espermatozoides. Se reconocen cuatro fases características en esta transformación: fase de golgi, fase de capuchón, fase acrosomal y fase de maduración (Olivera *et. al.*, 2006).



1. En la **fase de golgi**, la organela del mismo nombre se acerca al núcleo, desprende vesículas que se le superponen y poco a poco se unen para convertirse en la vesícula acrosomal que se localiza en la parte apical del núcleo. Los centriolos situados en forma de T, muy cercanos al aparato de golgi, van migrando hacia lo que será la base del núcleo. El centriolo proximal se sitúa en la parte basal del núcleo y a partir del centriolo distal crece el axonema conformado por dos microtúbulos centrales y 9 pares de microtúbulos periféricos. En la fase de capuchón, la vesícula acrosomal se aplana formando una verdadera capucha sobre el núcleo. El núcleo se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas, de tal forma que no puede haber ni replicación ni transcripción (Fase G0 del ciclo celular). La inactividad transcripcional del núcleo hace que el espermatozoide sea dependiente de modificaciones postranscripcionales como la fosforilación de proteínas necesarias para adaptar su función de acuerdo a las necesidades. Las fosforilaciones ocurren desde las células germinales, casi siempre en los residuos de tirosina, distinto a otras células eucarióticas en las que la mayoría de las fosforilaciones ocurren en residuos de serina y treonina (Olivera *et. al.*, 2006).
2. En la **fase acrosomal** la espermátide gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal; se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media. En esta fase el espermatozoide adquiere su morfología definitiva (Olivera *et. al.*, 2006).
3. Finalmente se sucede la **fase de maduración** donde se observan las características finales de los espermatozoides; forma de la cabeza característica de cada especie (oval y plana), cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma y la cola compuesta por las piezas media, principal y terminal (Figura 1). En la pieza media se encuentran las mitocondrias en forma de hélice. En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal de la cola originando la llamada gota citoplasmática. El proceso de maduración termina con la espermiación o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero. Mediante movimientos peristálticos los espermias son transportados de la *rete testis* a los ductos eferentes y de allí al epidídimo en cuya cola se almacenan (Olivera *et. al.*, 2006).

La espermiogénesis es la serie de cambios que experimenta la espermátide para su transformación en espermatozoides y los pasos son, como se muestra en la figura 4; a) formación del acrosoma, que se extiende sobre la mitad de la superficie nuclear y contiene enzimas que ayudan a la penetración del ovocito y de las capas que lo rodean durante la fecundación, b) condensación del núcleo, c) formación del cuello, pieza irremedia y cola, y d) eliminación de la mayor parte del citoplasma. En el ser humano, el tiempo necesario para que la espermatogonia se convierta en un espermatozoide maduro es de alrededor de 64 días (Sadler *et. al.*, 2004).

Figura 4. Etapas más importantes de la transformación de la espermátide humana en espermatozoide (Sadler *et. al.*, 2004).



Los espermatozoides completamente formados llegan a la luz de los túbulos seminíferos, desde donde son empujados hacia el epidídimo por los elementos contráctiles que se encuentran en la pared de los túbulos. Aunque en un principio son poco móviles, los espermatozoides alcanzan su movilidad completa en el epidídimo (Sadler, 2004).

c) Factores hormonales que estimulan la espermatogénesis

Varias hormonas desempeñan funciones fundamentales para la espermatogénesis, las cuales son:

Testosterona: Secretada por las células de Leydig localizadas en el intersticio testicular, es esencial para el crecimiento y la división de las células germinales testiculares, que es el primer paso para formar los espermatozoides.

Hormona Luteinizante (LH): Secretada por la adenohipófisis, estimula la secreción de testosterona por las células de Leydig.

Hormona Foliculoestimulante (FSH): También secretada por la adenohipófisis, estimula las células de Sertoli; sin esta estimulación, no se produciría la conversión de espermátide en espermatozoide (espermatogénesis).

Estrógenos: Formados a partir de la testosterona por las células de Sertoli cuando son estimuladas por la hormona foliculoestimulante, son también probablemente esenciales para la espermatogénesis.

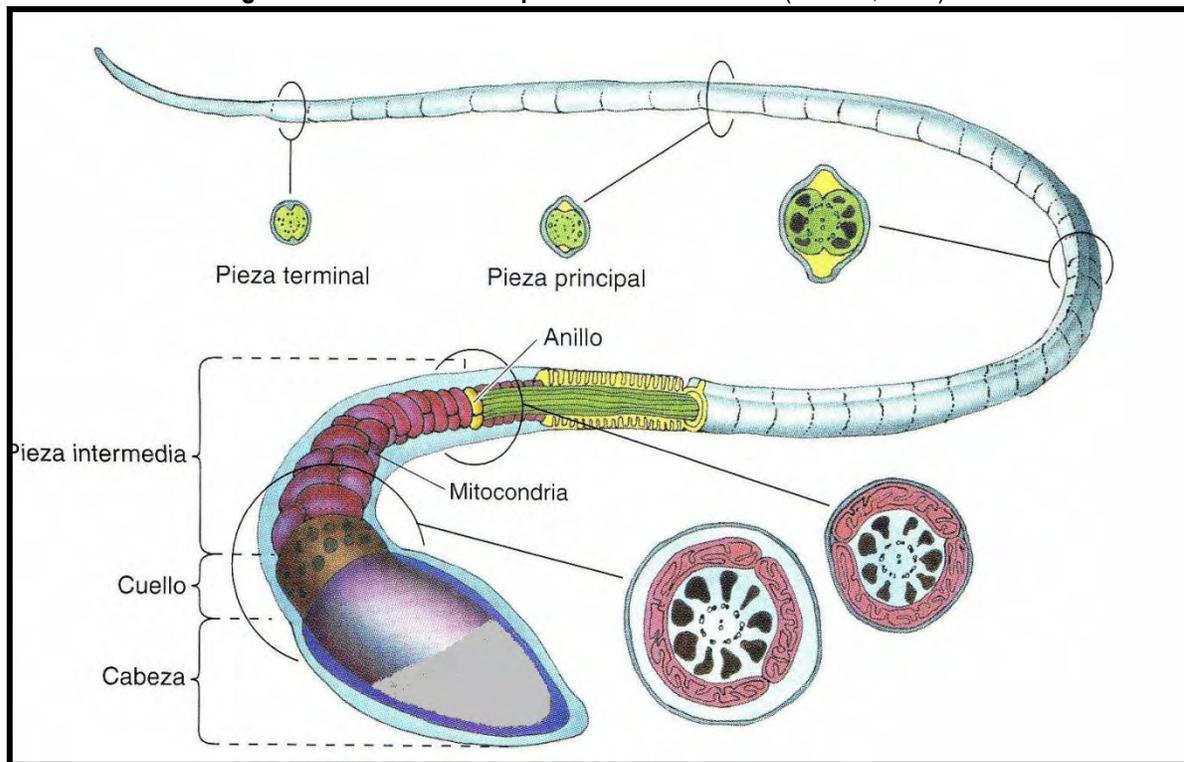
Hormona del Crecimiento (GH): Así como la mayor parte de las hormonas antes mencionadas, es necesaria para controlar las funciones metabólicas básicas de los testículos. Específicamente, la hormona del crecimiento promueve la división temprana de las propias espermatogonias; en su ausencia, como ocurre en el enanismo hipofisiario, la espermatogénesis es muy deficiente o no tiene lugar, causando esterilidad (Guyton, 2001).

d) Espermatozoides

Cada espermatozoide es una célula móvil compleja, rica en ADN, cuya cabeza está formada en su mayor parte por material cromosómico (Figura 5; Olvera *et. al.*, 2006; Gartner, 2002).

El acrosoma es una cobertura de la cabeza, a manera de gorra; se trata de un organelo similar a un lisosoma, rico en enzimas necesarias para la penetración espermática del óvulo y otros fenómenos implicados en la fertilización. La porción proximal de la cola móvil del espermatozoide está cubierta por una vaina que contiene muchas mitocondrias. La membrana de los espermátides tardías y los espermatozoides contienen una pequeña forma espiral de enzimas convertidoras de angiotensina (Olvera *et. al.*, 2006).

Figura 5. Estructura del espermatozoide humano (Gartner, 2002).



III. EJE HIPOTÁLAMO HIPOFISIARIO-GONADAL MASCULINO

El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal masculino es un sistema de retroalimentación de múltiples componentes, pero integrada con control interglandular (autocrinos y paracrinos) en cada nivel principal del eje y comunicación intraglandular entre los centros de control principales (por ejemplo, la hipófisis envía señales al testículo, y el testículo envía señales a la unidad hipotálamo-hipofisaria) (Yen *et. al.*, 1999).

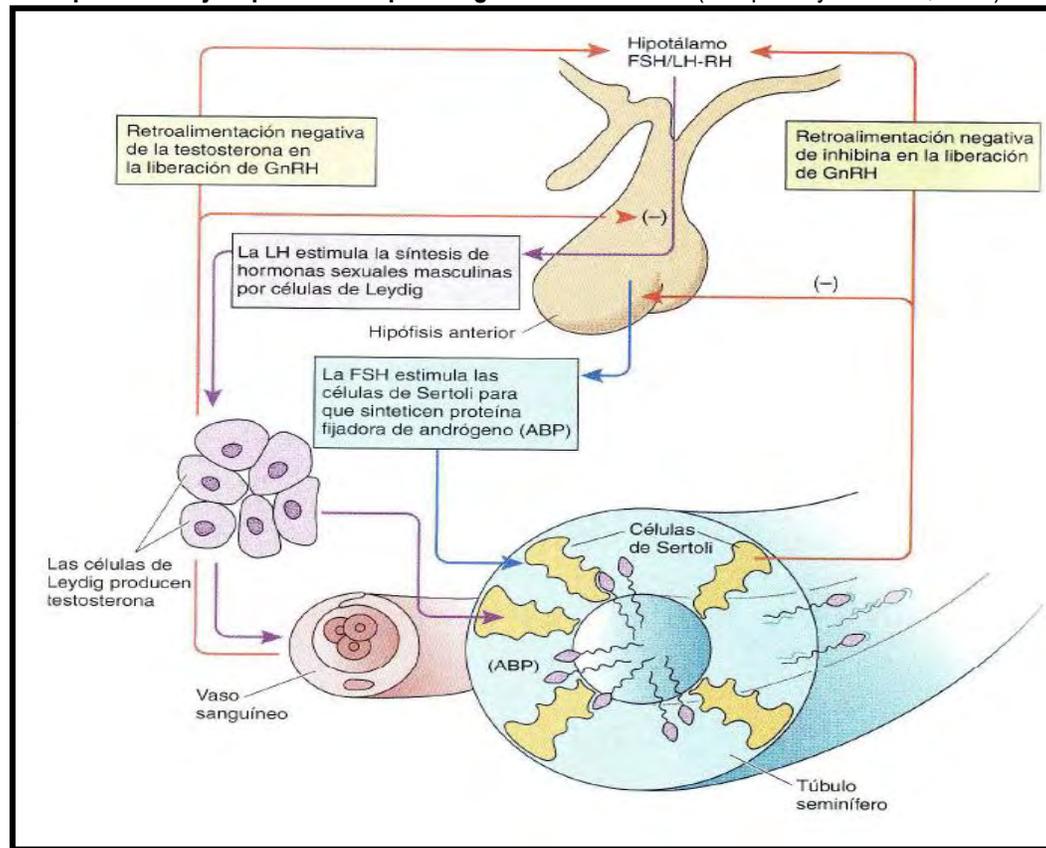
El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal del hombre sano comanda dos principales acciones que son esenciales para la reproducción en el hombre, a saber, la producción de cantidades fisiológicas de las hormonas esteroideas sexuales apropiadas, incluyendo andrógenos, a la

generación de células espermatogénicas sanas que se transformarán en gametos masculinos capaces de fertilizar el ovocito. Estas actividades reproductivas cruciales deben ser conducidas bajo diversas condiciones genéticas y ambientales potencialmente desfavorables (Yen *et. al.*, 1999).

El hipotálamo y la hipófisis anterior participan en conjunto en la regulación de las funciones testiculares de espermatogénesis y esteroidogénesis. El testículo también recibe información crítica de sus células a través de regulación paracrina y autocrina. En conjunto, las funciones del sistema reproductivo del hombre requieren una integración fisiológica entre elementos neuroglandulares individuales (hipotálamo, hipófisis, testículo) cada uno de ellos es complejo en sí mismo. El conjunto de un llamado sistema de control de retroalimentación y regulación anterógrada se muestra en la Figura 6 (Yen *et. al.*, 1999).

La liberación episódica de GnRH. Impulsa la LH pulsátil y, a su vez, la liberación de testosterona (regulación anterógrada), mientras que la testosterona regula negativamente la secreción de GnRH y LH (acción de retroalimentación). La regulación de retroalimentación mantiene las concentraciones normales en sangre de LH y testosterona durante el día y la noche (Yen *et. al.*, 1999).

Figura 6. Regulación esquemática de la relación de la retroalimentación y regulación anterógrada que opera en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal masculino (Junqueira y Carneiro, 2005).





IV. INFERTILIDAD MASCULINA

La infertilidad es un problema común que afecta a una de cada seis parejas y se estima que, el 50% de estos casos son atribuibles al factor masculino (Brugo *et. al.*, 2003).

Se puede definir a la infertilidad como la incapacidad de completar un embarazo luego de un tiempo razonable de relaciones sexuales sin tomar medidas anticonceptivas (aproximadamente un año en parejas jóvenes y seis meses en parejas adultas) (Morales *et. al.*, 2007; Brugo *et. al.*, 2003).

La infertilidad se puede clasificar en:

- Infertilidad primaria: Parejas que desean concebir y que en un periodo aproximado de un año de tener relaciones sexuales sin protección no lo logran.
- Infertilidad secundaria: Parejas que anteriormente ya han podido llevar un embarazo a término, pero que ya no pueden lograrlo de nuevo (Pagés y Aller, 2006).

El periodo de tiempo no se elige de modo arbitrario, sino que se basa en un estudio clásico en el que se evalúa la posibilidad de embarazo de las parejas infértiles que es de 20% al mes, llegado a un 93% la posibilidad acumulada de embarazo a lo largo de un año. Por otra parte, la posibilidad acumulada de embarazo en mujeres sometidas a fertilización con semen en fresco de donante se aproxima al 100% en 12 meses seguido de tratamiento.

Hay algunos factores que afectan de forma evidente a este lapso de tiempo como son: edad, tiempo de esterilidad, enfermedades orgánicas, enfermedades de transmisión sexual, situación laboral, deseo de la pareja así como genitales (vasectomía, amenorrea de más de seis meses, ligadura tubárica). Se aconseja iniciar el estudio antes de que transcurra un año, o bien iniciar directamente el tratamiento. Entre ellos el más importante es el estudio de la salud. (Remohí *et. al.*, 2008).

a) Etiologías clínicas de la infertilidad masculina

Las causas de la infertilidad masculina pueden ser congénitas (criptorquidia, hipospadias), infecciosas (parotiditis postpuberal, enfermedades de transmisión sexual), por patología urológica (prostatitis, litiasis), traumáticas, consecuencia de cirugía inguinoescrotal, asociadas a enfermedades pulmonares crónicas, disfunciones sexuales (eréctil, eyaculatorias), trastornos inmunológicos, genéticas, por lesiones neurológicas, por factores ambientales, tóxicos, tumorales o idiopáticas. Aunque, la mayoría de los casos, se deben a varicocele, infección de las glándulas sexuales accesorias, falla testicular u obstrucción de los conductos seminales, pero en muchos otros se considera de naturaleza idiopática (Edwards *et. al.*, 1995).

Algunas de las etiologías que se presentan en pacientes infértiles con mayor frecuencia son:

a.1) Varicocele

La insuficiencia valvular venosa de las venas espermáticas, manifestada por una dilatación del plexo pampiniforme o varicocele, es una causa importante de infertilidad que se presenta hasta en el 40% de los varones infértiles a diferencia de una frecuencia del 15% en la población fértil. Sin embargo, para que el varicocele pueda ser considerado como una causa de infertilidad, debe estar relacionado con alteraciones en el análisis del semen. En base a ello, el varicocele es responsable de alrededor del 20% de los casos de infertilidad masculina (Teppa y Palacios, 2004).



Diferentes teorías explican el mecanismo de esterilidad en el varicocele:

1. Insuficiencia del eje hipotálamo-hipofisario-testículo.
2. Temperatura escrotal: En el varicocele hay una elevación de la temperatura escrotal que provoca una disminución de la espermatogénesis.
3. Reflujo de metabolitos suprarrenales.
4. Hipertensión venosa e hipoxia gonadal (Jarow *et. al.*, 1996; Aldave, 1994).

Se distinguen tres tipos de varicocele:

Espermático, *cremastérico* o mixto. En el 68% de los casos el varicocele es espermático, afectando a la vena espermática interna y al plexo anterior. Es más frecuente en el lado izquierdo (80-93%), debido a la mayor longitud de la vena espermática izquierda y su anatomía desembocando en la vena renal izquierda con válvulas incompetentes (Schoor *et. al.*, 2001; Pomerol y Arrondo. 1994).

Se han descrito tres tipos de alteraciones en el estudio hemodinámico del varicocele (Sánchez *et. al.*, 2005).

1. Tipo 1: Reflujo venoso de la espermática y comunicantes.
2. Tipo 2: Obstrucción de la vena ilíaca común izquierda con retorno venoso por la espermática normal.
3. Tipo 3: Engloba a los dos anteriores.

a.2) Infección de las glándulas accesorias masculinas

Las infecciones del tracto reproductor masculino son una causa importante de infertilidad masculina. En general, las infecciones de los testículos, epidídimos, próstata y vías urinarias, asociadas con pioespermia, contribuyen con alrededor del 5% de las causas de infertilidad masculina en la mayoría de los centros de reproducción mundiales (Edwards *et. al.*, 1995).

Por mencionar un ejemplo:

Orquitis: Es la inflamación de uno o ambos testículos, causada con frecuencia por infección. La orquitis puede ser causada por numerosos organismos bacterianos y virales y generalmente es una consecuencia de una epididimitis o inflamación del epidídimo (el tubo que conecta los vasos deferentes y el testículo) (Brugo *et. al.*, 2003).

La causa viral más común de orquitis es la parotiditis. Aproximadamente, el 30% de los pacientes que contraen después de la pubertad desarrollan orquitis durante el curso de la enfermedad. Es más común en chicos adolescentes (raro antes de los 10 años) y generalmente se manifiesta de 4 a 6 días después del comienzo de las paperas. En un tercio de chicos que desarrollan orquitis causada por paperas, se presenta la atrofia testicular (encogimiento de los testículos) (Burgo *et. al.*, 2003).

La orquitis también puede ocurrir juntamente con infecciones de la próstata o el epidídimo y, al igual que estas condiciones, puede ocurrir como una manifestación de enfermedades de transmisión sexual como gonorrea o clamidia. La incidencia de la orquitis o la epididimitis por transmisión sexual es más alta en los hombres de 19 a 35 años de edad (Burgo *et. al.*, 2003).



a.3) Factor genético

Las causas genéticas involucran a menos del 5% de los casos, las cuales son más frecuentes cuando el número de espermatozoides es menor de 10 millones por mL, en los casos de hipogonadismo hipergonadotrópico o en los hombres mayores de 40 años; no obstante, se ha observado que las causas genéticas pueden involucrar aún más casos (alrededor del 24%), cuando los hombres presentan azoospermia u oligozoospermia severa (Dohle *et. al.*, 2002). La forma más común de trastorno cromosómico numérico asociado a falla testicular es el síndrome de Klinefelter, caracterizado por una fórmula cromosómica 47 XXY, hábito eunuco, retraso mental leve, ginecomastia y azoospermia, por hipogonadismo hipergonadotrópico. En estos casos, cuando se realiza la biopsia testicular se observa hialinización de los túbulos seminíferos, ausencia de espermatogonias e hiperplasia de las células de Leydig (Teppa y Palacios, 2004).

Sin embargo, desde hace tiempo se conoce la existencia de varones azoospermicos con cariotipo normal, pero con deleciones en el brazo largo del cromosoma (Tiepolo y Zuffardi, 1976).

El hipogonadismo esta causado por la capacidad genética del hipotálamo para secretar cantidades anormales de GnRH. Esto se asocia con frecuencia a una anomalía simultánea del centro de la alimentación del hipotálamo, que induce a la persona a comer excesivamente. En consecuencia, aparece obesidad y euniquismo (Deficiencia de la función de las hormonas masculinas o de su formación en los testículos. que conduce a la esterilidad y a una talla anormal, testículos pequeños y desarrollo deficiente de los caracteres sexuales secundarios, de la libido y de la potencia sexual) (Guyton, 2001).

a.4) Factor inmunológico

Las causas inmunológicas constituyen alrededor del 5% de la casuística. En general, los anticuerpos antiespermatozoides afectan la fertilidad de algunos individuos, debido a reacciones de citotoxicidad, aglutinación e inmovilización espermática, o alteración de las reacciones de capacitación o reacción acrosómica (Brugo *et. al.*, 2003; Edwards *et. al.*, 1995).

a.5) Factor endocrino

Los trastornos endocrinos constituyen menos del 5% de las causas de infertilidad en el hombre; sin embargo, lógicamente ellos implican mayor relevancia clínica, independientemente de la infertilidad (Jarow, 2003). Por ejemplo, los casos de hipogonadismo hipogonadotrópico son muy poco frecuentes, representando alrededor del 1% de la casuística total, pero involucran otros factores que comprometen la salud del individuo. A su vez, algunos hombres obesos pueden padecer de infertilidad, al manifestar niveles séricos reducidos de las hormonas luteinizantes, testosterona (T) y globulina sexual fijadora de las hormonas sexuales, asociado a un aumento de la aromatización de la T, que modifica negativamente el radio T/estradiol (Jarow *et. al.*, 1993). Por su parte, la diabetes mellitus puede provocar disfunción sexual eréctil por neuropatía autónoma simpática, que está directamente relacionada con el control y la duración de la enfermedad (Dinulovic y Radonjic, 1990).

La hiperprolactinemia se manifiesta en el hombre como un hipogonadismo hipogonadotrópico, debido a que reduce la pulsatilidad de la hormona hipotalámica liberadora de



gonadotropinas (GnRH). Este hecho refleja una reducción de los niveles de gonadotropinas y andrógenos, lo cual explica las manifestaciones clínicas que se presentan con mayor frecuencia, como son la disfunción sexual y la disminución de la libido (Edwards *et. al.*, 1995). En forma crónica, puede alterarse la espermatogénesis, y presentarse ginecomastia y galactorrea (Teppa y Palacios, 2004).

a.6) Enfermedades sistémicas

El síndrome de Kartagener se caracteriza, estructuralmente, por la ausencia de los brazos internos y externos del axonema de la cola del espermatozoide clínicamente, por infecciones respiratorias recurrentes (bronquiectasia y sinusitis), dextrocardia y esterilidad. Otras entidades nosológicas que relacionan la infertilidad con las patologías crónicas del tracto respiratorio son el síndrome de Young (similar al síndrome de Kartagener pero sin la afectación cardiaca), y la fibrosis quística, una enfermedad metabólica con patrón de herencia autosómico recesivo, común en la raza aria, caracterizada por azoospermia obstructiva. Las afecciones renales y otras enfermedades sistémicas pueden comprometer de manera indirecta la fertilidad (Teppa y Palacios, 2004).

a.7) Alteraciones nerviosas de la eyaculación

Eyaculación retrógrada

En condiciones fisiológicas la eyaculación consta de tres etapas: inicialmente ocurre la emisión de semen desde el conducto deferente hasta la uretra posterior, debido a la estimulación de los nervios simpáticos; en una segunda etapa se produce la contracción de la uretra posterior y el cierre del cuello vesical; finalmente, por la mediación del parasimpático y la contracción de los músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso se produce la eyaculación anterógrada (Edwards *et. al.*, 1995; Hershlag *et. al.*, 1991).

Se denomina eyaculación retrógrada a la falla en el cierre del cuello vesical y consecuente escape de semen hacia la vejiga durante la fase de emisión de la eyaculación. Esta alteración ocurre en 0,3-2,0% de la infertilidad de causa masculina (Kamischke, Nieshlag 1999; Murphy, Lipshultz 1987). Se produce con mayor frecuencia en forma iatrogénica, secundaria a prostatectomía transuretral, linfadenectomía retroperitoneal o por neuropatía diabética (Yavetz *et. al.*, 1994).

La consecuencia inmediata es la ausencia parcial o total de flujo seminal en el eyaculado (Yavetz *et. al.*, 1994).

Factor psicológico

La eyaculación precoz, que impide una inseminación vaginal adecuada, puede tener una causa sistémica por esclerosis múltiple o prostatitis, pero la más común es la psicológica. También pueden involucrar causas psicológicas la aneyaculación o ausencia de la eyaculación, además de la eyaculación retrógrada (Brugo *et. al.*, 2003).

Disfunción eyaculatoria: Existen diferentes tipos de alteraciones de la eyaculación. Aneyaculación significa ausencia de eyaculación, producida por traumatismo como en el caso de los pacientes con una sección completa o incompleta de la médula, que puede ser iatrogénica (luego de un vaciamiento ganglionar retroperitoneal), farmacológica (ingesta de antihipertensivos, antidepresivos, antipsicóticos, etc.), metabólica (diabetes) y psicológica. La eyaculación retrógrada



también puede ser de origen traumático, iatrogénico, farmacológico, metabólico o psicológico (Brugo *et. al.*, 2003)

La eyaculación prematura que impide una inseminación vaginal adecuada puede tener una causa sistémica, como en algunos casos de esclerosis múltiple. También puede ser debida a inflamaciones como las que aparecen en la prostatitis. La causa más frecuente es la psicológica (Burgo *et. al.*, 2003).

a.8) Cáncer testicular

Se ha observado un aumento de la prevalencia del cáncer testicular en hombres infértiles que se ha asociado a enfermedades genéticas, exposición a gonadotoxinas y otras causas. Por otra parte, la infertilidad masculina es también una forma de presentación del cáncer testicular, que afecta principalmente a los varones jóvenes de 30 a 40 años (Palacios, 1997). El adenocarcinoma es el cáncer más frecuente, con predominio del seminoma de acuerdo con la variante histológica. Para tener una idea acerca de su incidencia, Schulze y colaboradores en 1999, realizaron un total de 1418 biopsias testiculares en 766 varones con compromiso severo de los parámetros seminales, encontrando en cinco de ellos cáncer testicular *in situ*. En Brasil, Pasqualotto y colaboradores en 2003, encontraron 7 casos de cáncer testicular en pacientes infértiles, durante un período de observación de 15 años.

a.9) Gonadotoxinas

Para finalizar, no se debe dejar de mencionar el daño producido por distintos agentes ambientales sobre la espermatogénesis. Sobre este particular, se tiene principalmente al alcohol y la nicotina (Klonoff-Cohen *et. al.*, 2003; Künzle *et. al.*, 2003). El alcohol tiene un efecto inhibitorio directo sobre la biosíntesis de T por las células de Leydig y sobre el metabolismo hepático de los estrógenos; en consecuencia, se producen niveles bajos de T y altos de estradiol en la circulación, por tanto, el alcohol induce efectos directos sobre el espermatozoide generando una disminución de su motilidad. El abuso de otras drogas como la marihuana y la cocaína también comprometen la fertilidad.

Del mismo modo, los varones expuestos a ciertos solventes presentan menores concentraciones de LH, mientras los hombres expuestos a ciertos pesticidas tienen niveles séricos de estradiol elevados, disminución de la motilidad y del cálculo de los espermatozoides con incremento en las formas anormales (Oliva *et. al.*, 2001) por uso de plaguicidas debido al repunte de enfermedades como el dengue y el paludismo.

Ciertas drogas de la farmacopea también tienen efectos muy negativos sobre la espermatogénesis; entre ellas destacan la sulfasalazina, la cimetidina, el ketoconazol y los agentes alquilantes como la ciclofosfamida, entre otros. Por último, como es ampliamente conocido que las radiaciones pueden provocar cambios en los cromosomas, no es extraño que se haya reportado que la radioterapia tiene mayor efecto lesivo sobre las espermatogonias (Edwards *et. al.*, 1995).



a.10) Infertilidad inexplicable

La infertilidad inexplicada o sin causa aparente es un término usado para aquellos casos en los que los estudios de la infertilidad muestran resultados normales. Esta situación ocurre en alrededor del 15% de las parejas. Las parejas con infertilidad inexplicada podrían tener un defecto sutil en su capacidad reproductiva, que no puede ser identificado a través de una evaluación estándar. También es posible la existencia de causas específicas, pero desconocidas hasta la fecha o que su detección está más allá del dominio de los procedimientos diagnósticos disponibles (Crosignani *et. al.*, 1993).

V. ESTUDIOS BÁSICOS DEL VARÓN INFÉRIL

a) Historia clínica

La historia clínica permite orientar el diagnóstico; por tanto, se aconseja realizar una historia integral que comprenda básicamente el interrogatorio acerca del motivo de consulta, antecedentes patológicos personales y familiares, antecedentes de fertilidad (paciente y pareja), función sexual y hábitos psicobiológicos (Tabla 1) (para detectar la posible exposición a drogas, factores ambientales y/o laborales) (Rodríguez *et. at.*, 2000).

Tabla 1. Antecedentes para la evaluación del hombre infértil (Pagés y Aller, 2006).

Antecedentes sexuales
Duración de las relaciones sexuales con control de natalidad y sin ella. Métodos de control de natalidad. Técnica sexual: potencia, empleo de lubricantes (algunos son espermicidas). Frecuencia y momento del coito.
Antecedentes personales
Desarrollo: antecedentes de criptorquidia, edad de la pubertad, ginecomastia anomalías congénitas del tracto urinario o del Sistema Nervioso Central. Quirúrgicos; orquidopexia, cirugía pelviana, escrotal, inguinal o retroperitoneal, hernioplastia, simpatectomía, vasectomía, traumatismo escrotal, lesiones de la médula ósea, torsión testicular. Médicos: infecciones urinarias, enfermedades de transmisión sexual, orquitis virales, enfermedades renales, diabetes, radioterapia, enfermedad febril reciente, epididimitis, tuberculosis y otras enfermedades crónicas, anosmia, defectos de la línea media (paladar hendido). Fármacos: Lista completa de todos los fármacos presentes y pasados. Muchos fármacos interfieren en la espermatogénesis, la erección o la eyaculación. Ocupación y hábitos: Exposición de agentes químicos y al calor, baños calientes, baños de inmersión, radiación, cigarrillos, alcohol, drogas ilícitas y anabólicos esteroides. Antecedentes sobre embarazo e hijos con otras parejas. Evaluación y tratamiento previo para la infertilidad.
Antecedentes Familiares
Hipogonadismo. Criptorquidia. Defectos congénitos de la línea media. Fibrosis quística.
Antecedentes reproductivos femeninos
Antecedentes de embarazo he hijos con otras parejas, Antecedentes sobre la menstruación y evaluación de infertilidad hasta el presente.



b) Evaluación andrológica

b.1) Examen físico integral

La exploración andrológica se enfoca sobre el pene (buscando fimosis, hipospadias, cicatrices, placas de induración), testículos y epidídimo (posición, tamaño, consistencia y sensibilidad). El volumen testicular se aprecia mejor con el orquidómetro de Prader o el de Seager, considerándose un volumen de 20 a 24 cc como normal, mientras un volumen menor a 10 cc traduce una importante disminución del tejido espermatogénico. El tacto rectal se realiza sólo en aquellos casos que se considera conveniente evaluar características de la próstata (Teepa y Palacios, 2004).

b.2) Espermiograma de infertilidad

Es un estudio en el cual se analizan características microscópicas del eyaculado que comprenden fundamentalmente al volumen, color, pH, licuefacción, viscosidad y olor. Posteriormente, se inicia el estudio microscópico, mediante el cual se estudian en forma cuantitativa y cualitativa a los espermatozoides, la aglutinación (cuando están vivos, unidos entre sí) o la agregación (cuando están probablemente muertos, unidos a otras células y *debris*), entre ellos y la existencia de otras células (Teepa y Palacios, 2004).

Actualmente, el único examen que genera información sobre el estado reproductivo del hombre es el espermiograma, en el cual se realiza una descripción de aspectos cualitativos y cuantitativos relacionados con las características espermáticas que tiene el eyaculado como: volumen, pH, motilidad, viabilidad, concentración y morfología (Tabla 2; WHO, 1999).

El análisis de semen se realiza siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud para determinar la etiología del varón, dependiendo de las características del eyaculado (Tabla 3; WHO, 1999). El análisis morfológico también se pueden realizar mediante los criterios estrictos de Krüger, (Krüger, 1988).

Tabla 2. Parámetros de análisis para el semen (WHO, 1999).

Volumen	≥ 2 mL
pH	7.2-8.0
Motilidad	≥ 50% progresión lineal (“a” + “b”) ¹ ≥ 25% progresión lineal rápida (“a”) ¹
Concentración espermática	≥ 20 x 10 ⁶ espermatozoides/mL
Viabilidad	≥ 75% espermatozoides vivos
Leucocitos	< 1 x 10 ⁶ leucocitos/campo
Agglutinación	Negativa
Morfología	
Criterios estrictos de Krüger	≥14% espermatozoides con formas normales
Criterios de la OMS	≥ 30% espermatozoides con formas normales

¹ Ver tabla 4.



Tabla 3. Nomenclatura del análisis de semen (WHO, 1999).

Normozoospermia	Eyaculado normal
Oligozoospermia	Concentración < 20 × 10 ⁶ espermatozoides/mL
Astenozoospermia	< 50% espermatozoides "a" + "b" ¹ < 25% espermatozoides "a" ¹
Teratozoospermia*	< 30% espermatozoides con formas normales < 14% espermatozoides con formas normales
Azoospermia	Ausencia de eyaculado
Oligoastenoteratozoospermia	Alteración de las tres variables

* Criterios de la OMS y criterios estrictos de Krüger.

¹ Ver tabla 4.

Para que se realice un análisis de semen en condiciones óptimas se debe de tomar en cuenta lo siguiente:

b.2.1) Recolección de la muestra

La muestra de semen debe obtenerse por masturbación directamente en un recipiente estéril de boca ancha. Hasta su posterior análisis, el semen debe mantenerse a temperatura ente 20 a 40 °C. Cuando la muestra no se pueda obtener por masturbación será necesario recurrir a la utilización de preservativos especiales sin espermicidas. Nunca se deberá utilizar el coitus interruptus para recoger una muestra de semen ya que se puede perder la primera parte del eyaculado y pueden aparecer en el análisis células procedentes de la vagina (Remohí *et. al.*, 2008).

El eyaculado en general es expulsado en cuatro fracciones diferentes:

- 1.- La fracción preeyaculatoria, procedente de las glándulas de Cowper y Littre, es de consistencia mucosa y está exenta de espermatozoides.
- 2.- Fracción previa, completamente fluida, proviene de la próstata, y tampoco presenta espermatozoides. Supone del 13 al 33% del total del eyaculado, posee un pH ácido y se caracteriza por su elevada concentración de fosfatasa ácida y ácido cítrico.
- 3.- Fracción principal, que consta tanto de elementos líquidos como de elementos gelatinosos, es la más rica en espermatozoides y procede del epidídimo, deferente y ampolla deferencial.
- 4.- Fracción terminal, gelatinosa, es la más abundante del eyaculado, 50-80%. Procede de las vesículas seminales, por lo que es rica en fructosa. Posee pH alcalino y espermatozoides, aunque la mayoría inmóviles (Remohí *et. al.*, 2008).

La muestra debe ser obtener completa ya que la porción principal del eyaculado contiene una concentración más alta de espermatozoides junto con las secreciones del testículo, el epidídimo, el conducto deferente, los líquidos de la próstata y la vesícula seminal. La mayor parte de los espermatozoides eyaculados provienen de la porción distal del epidídimo, con una pequeña contribución de la ampolla del conducto. (Thomas *et. al.*, 2007).

b.2.2) Índices macroscópicos

Valoran la función de glándulas excretoras:



Licuefacción y Viscosidad: Es la resultante de la acción de las enzimas proteolíticas del plasma seminal y el olor es condicionado por la seminina y seminogelina, (Hellstrom, 1997).

Es muy importante no confundir licuefacción con viscosidad. La viscosidad se refiere a la fluidez de toda la muestra. Así, ésta puede ser normal aunque su licuefacción sea incompleta.

Las muestras mezcladas incorrectamente son, probablemente, la mayor fuente de error en la determinación de la concentración espermática, por lo que es importante una adecuada homogenización.

Una muestra de semen normal se licua como máximo 60 minutos a temperatura ambiente tras la recogida, aunque habitualmente esto ocurre antes de los primeros 20-30 minutos. Debe quedar constancia si este hecho no se produce. La presencia a veces de gránulos gelatinosos en el semen, parece no tener interés clínico (WHO, 1999).

En caso de no se licue correctamente la muestra se deberá (Remohí *et. al.*, 2008):

- Mezclar la muestra mecánicamente
- Realizar una digestión enzimática con 1 g/L de bromelia
- Añadir 250 UI de quimiotripsina
- Añadir un volumen igual del medio y pipetear repetidamente

Aspecto: El aspecto del semen se valorará por su color, opacidad/transparencia, y presencia de cuerpos mucosos o gelatinosos. El semen humano es normalmente un líquido homogéneo opalescente de color blanquecino amarillento (WHO, 1999).

Si la muestra está contaminada con sangre (hematospermia), presentará un color rosáceo, más intenso cuando mayor sea la concentración. Si la concentración se debe a bilirrubina o a que el paciente está tomando vitaminas, presentará un color amarillo intenso. El semen es menos opaco cuando contiene una concentración de espermatozoides muy baja.

El semen normal puede contener unos gránulos mucosos (gel) que no se licuan pero este hecho no parece tener significado clínico (WHO, 1999).

Volumen: El volumen de plasma seminal está condicionado por la secreción de las vesículas seminales en un 80% y el resto es de próstata, glándulas bulbouretrales y epidídimo (Hellstrom, 1997).

El volumen del semen debe medirse con un tubo graduado. Las jeringas de plástico no deberían utilizarse porque pueden afectar la movilidad espermática y las agujas no son seguras (Remohí *et. al.*, 2008).

Volumen: bajo se denomina (hipospermia) o alto (hiperspermia).

El pH: Está dado por la presencia de fructuosa que proviene de las vesículas seminales, así como del ácido cítrico y fosfatasa ácida que son secretados por la próstata (Hellstrom, 1997).



El pH de la muestra debe ser igual o superior a 7.2. Cuando el pH es inferior de 7 es una muestra con azoospermia, debe pensarse en una disgenesia de los vasos deferentes o en una obstrucción de los conductos eyaculadores (Remohí *et. al.*, 2008).

b.2.3) Índices microscópicos

El objetivo de realizar el examen microscópico de una muestra de semen es estimar las posibilidades que las características del eyaculado presenta para poder iniciar un embarazo que se pueda llevar a término o para elegir las técnicas de reproducción asistida que ofrezcan mejores expectativas en función de coste/beneficio (Garrido *et. al.*, 2002).

En el estudio microscópico de una muestra se valora la concertación, movilidad, morfología y aglutinación de los espermatozoides, así como la presencia de otros elementos celulares, como los leucocitos o células germinales inmaduras (Remohí *et. al.*, 2008; WHO. 1999).

La concentración: Valora la función testicular y la permeabilidad de los conductos excretorios, (Mazundar y Levine 1998; Jedrzejczak *et. al.*, 1996).

La determinación exacta de la concertación de espermatozoides (millones de espermatozoides por mililitro de semen) y de su cantidad total en el líquido eyaculado (millones de espermatozoides por eyaculación) es muy importante, considerándose ambos parámetros fundamentales para evaluar la calidad de semen (Remohí *et. al.*, 2008).

La movilidad: Valoran la función de los epidídimos y la interacción de los espermatozoides con el plasma seminal (Mazundar y Levine 1998; Jedrzejczak *et. al.*, 1996).

Existen cuatro categorías de espermatozoides, en función de la movilidad que presentan (Tabla 4; WHO, 1999).

Tabla 4. Tipos de movilidad espermática (WHO, 1999).

CLASIFICACIÓN	TIPO DE MOVILIDAD	VELOCIDAD
Clase a	Excelente (velocidad alta con trayectoria rectilínea)	>25µm/s a 37°C >20µm/s a 20°C
Clase b	Moderada(velocidad media con trayectoria poco o nada rectilínea)	5>X<µm/s
Clase c	No progresiva (movimiento del espermatozoide sin apenas sin movimiento)	<5µm/s
Clase d	Ausencia de movilidad	0µm/s

*25µm son aproximadamente la longitud de 5 cabezas o la mitad de la longitud del flagelo.



Morfología: El estudio de las características morfológicas de los espermatozoides es tan importante para completar la evaluación de una muestra de semen como el análisis de su movilidad y concentración (Garrido, 2005).

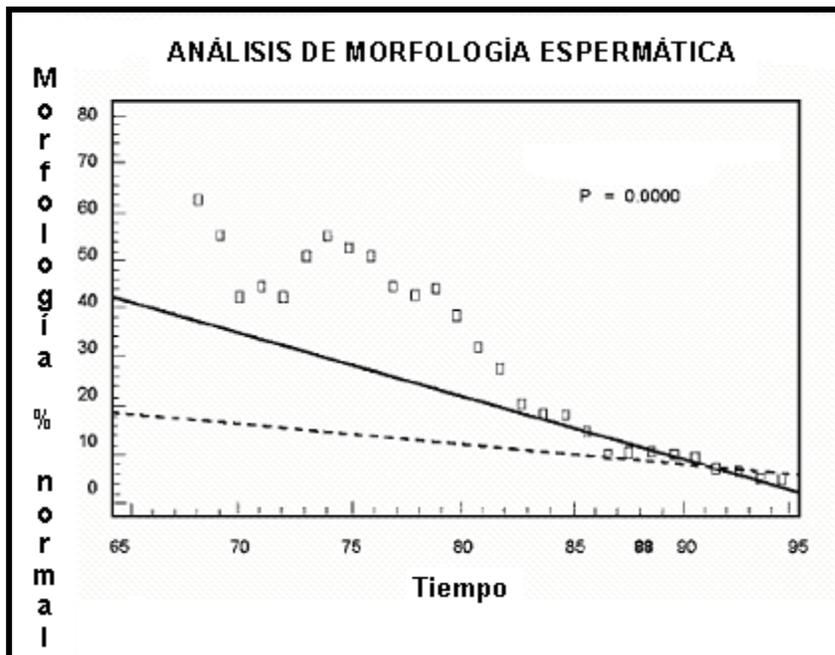
El análisis morfológico de los espermatozoides se basa principalmente en el estudio visual en el microscopio de la forma de estas células después de haber sido extendidas sobre un portaobjetos, secado al aire y teñido. La tinción se realiza con sustancias basófilas o acidófilas, de unión al núcleo o citoplasma respectivamente, que anteriormente han sido fijadas con alguna alcohol (Garrido, 2005).

La extensión de Papanicolaou es el método más utilizado en los laboratorios de andrología y el recomendado por el manual de la OMS. Permite la tinción de las regiones acrosómicas y postacrosómicas de la cabeza, la gota citoplasmática, la pieza media y la cola. En algunos laboratorios se utilizan otros métodos de tinción rápida como el Dic-Quik (Dade Diagnosis, Miami, EE. UU.) o la tinción de Hemacolor para microscopía (Merck) (Remohí *et. al.*, 2008).

Para definir un espermatozoide como normal deben establecerse los criterios de normalidad. Estos fueron decididos del estudio de los espermatozoides hallados en el orificio cervical interno del cuello uterino tras una relación sexual en parejas fértiles (Garrido, 2005).

La población de espermatozoides presentes en un eyaculado en la especie humana es extremadamente heterogénea en relación a la forma, tanto entre distintos individuos como dentro del mismo individuo (Grafica 1; Mortimer, 2001).

Grafica 1. Diagrama de dispersión media de porcentaje de morfología (Mortimer, 2001).





Las características de un espermatozoide normal son (WHO, 1999):

CABEZA:

- Oval de contorno regular (puede variar entre 4 y 5 μm de longitud y 2.5 – 3.5 μm de anchura).
- Con una parte anterior pálida.
- Acrosoma (entre el 40 y el 70% del área de la cabeza).
- Región posterior más oscura (núcleo).
- La relación longitud – anchura debe ser de 1.50 – 1.75.

PIEZA MEDIA:

- Deba ser más gruesa que la cola (grosor máximo: 1 μm).
- Longitud aproximada de 7 – 8 μm .
- Si presenta algún residuo citoplasmático no debe superar la mitad de la cabeza del espermatozoide.

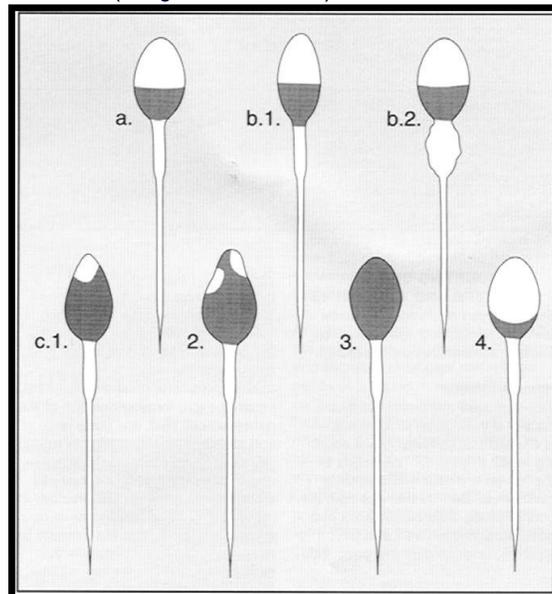
COLA

- Debe ser uniforme.
- Mas estrecha en que la cabeza media.
- No espiralizada.
- Sin restos citoplasmáticos.
- Longitud aproximada de 45 μm .

Los espermatozoides humanos exhiben una gran cantidad de anomalías deferentes ligadas a distintas partes de su estructura. Estas anomalías se clasifican en defecto de cabeza, pieza media y cola (Figura 7; WHO, 1999).

Figura 7. Diagrama que representa las anomalías espermáticas

a) Formas normales: cabeza, forma oval, sin ningún problema, acrosoma del 40 a 70 %, sin defectos en cuello, pieza media y cola. Longitud de la cabeza; 5 o 6 Mm, con un diámetro de 2,5 a 3,5 μm . B. 1. Muy poco amorfa de cabeza; ligeramente alargada, pérdida de forma oval, acrosomal 40% a 70%, con un diámetro de 2,5 μm 2. B. 2. Poco amorfo, defecto en cuello; cuello, pero forma normal de cabeza. C. Formas amorfas graves; anormalidades en la forma del acrosoma. C. 1, 2. Anormalidades acrosoma pequeño. C. 3, 4. Acrosomal mayor al 70% de la cabeza (Krüger *et. al.*, 1988).



La vitalidad: La lectura de esta característica discrimina a los espermatozoides inmóviles de los vivos o muertos, los espermatozoides vivos presentan la membrana intacta, por lo que no se teñirán. Los espermatozoides muertos presentan la membrana dañada, por lo que el colorante entra con facilidad (Remohí *et. al.*, 2008; Mazunda y Levine 1998; Jedrzejczak *et. al.*, 1996).

Aglutinación: La aglutinación, presencia de leucocitos, células epiteliales y detritus cuando se encuentra en gran número o porcentaje son signos patológicos, (Mazundar y Levine 1998; Jedrzejczak *et. al.*, 1996). Se considera que hay aglutinación cuando los espermatozoides móviles están unidos entre sí bien por la cabeza o por la cola, bien cabeza-cola. Esta definición no incluye los espermatozoides inmóviles o unidos a células o dendritas. En este caso se habla de pseudo aglutinación o agregaciones (Remohí *et. al.*, 2008).

c) Valoración endocrina

La valoración endocrina del varón debe realizarse si se observa un seminograma anormal, especialmente si la concentración espermática es inferior a 10 millones/ml, si existe alguna disfunción o si se observan alteraciones que sugieran la presencia de endocrinopatías (Padrón, 1998).

La valoración endocrina mínima debe incluir la determinación sérica de FSH, LH, prolactina (PRL) y testosterona (Tabla 5).



Tabla 5. Valoración Endócrina (Padrón, 1998).

Valoración clínica	FSH	LH	Testosterona	Prolactina
Espermatogénesis normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Hipogonadismo Hipogonadotrópico	Bajo	Bajo	Bajo	Normal
Espermatogénesis anormal*	Alto/normal	Normal	Normal	Normal
Fallo testicular completo/ Hipogonadismo Hipogonadotrópico	Alta	Alta	Normal/Baja	Normal
Tumor pituitario secretor de prolactina	Normal/ Baja	Normal/ Baja	Bajo	Bajo

*Muchos varones con espermatogénesis anómala tiene niveles plasmáticos de FSH normales. Sin embargo, una marcada elevación de FSH es indicativa de alteraciones en la espermatogénesis (Padrón, 1998).

d) Análisis bioquímico del plasma seminal

Aunque el análisis bioquímico del plasma seminal no forma parte del espermograma tradicional, en la actualidad, en muchos laboratorios se están realizando mediciones de varios marcadores de la función de las glándulas sexuales accesorias (Tabla 6; Padrón, 1997).

Tabla 6.- Principales marcadores seminales de la función de las glándulas sexuales accesorias (Padrón, 1997).

Glándulas accesorias	Marcadores
Epidídimos	Alfaglucosidasa
	Carnitina libre
	Glicerilfosforilcolina
Vesículas seminales	Fructosa
	Prostaglandinas
Próstata	Ácido cítrico
	Fosfatasa ácida
	Cinc (Zn)

El análisis bioquímico está indicado especialmente cuando el volumen eyaculado se encuentra por debajo de lo normal (< 1,5 mL), cuando existe una rápida disminución de la movilidad de los espermatozoides o cuando se quiere investigar el efecto de medicamentos, tóxicos u otros factores sobre la función de las glándulas sexuales accesorias. Estas mediciones también deben indicarse en todos los pacientes azoospermicos (WHO, 1999; Padrón, 1990; Pérez, 1984).

En general, la disminución de la función secretoria de dichas glándulas se refleja en una disminución en el plasma seminal del marcador específico. Un inconveniente de estas determinaciones es que en ocasiones hay trastornos, por ejemplo infecciones, que causan



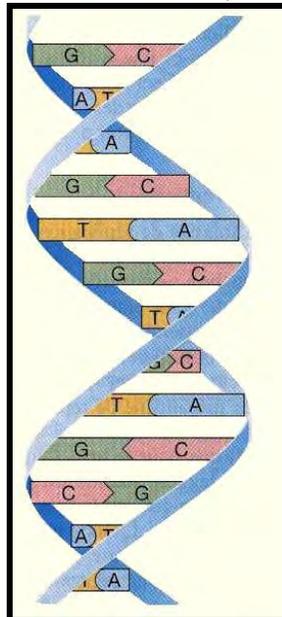
disminución de la función secretoria de una glándula, pero la cantidad total del marcador todavía se mantiene en el rango "normal"; también puede ocurrir que la infección cause un daño irreversible del epitelio secretor y que entonces, incluso después de curada ésta con tratamiento, el valor del marcador se mantenga por debajo del rango normal (WHO, 1999).

Además de las infecciones seminales, que son la causa más común, otros trastornos que pueden afectar la capacidad secretora de las glándulas sexuales accesorias son las inflamaciones (de cualquier causa), así como las obstrucciones totales o parciales de las vías seminales, generalmente secuelas de infecciones o inflamaciones. Aunque, teóricamente, los tumores de la región y las anomalías congénitas de las glándulas accesorias también pueden provocar disminución de su función, en la práctica clínica diaria estos trastornos son muy raros (Padrón, 1998).

VI.- CARACTERÍSTICAS DEL ADN

La doble hélice es el rasgo estructural característico del ADN. Las dos cadenas de polinucleótidos están enrolladas, una alrededor de la otra. Dos pares de bases nitrogenadas, ya sean Adenina-Timina o Guanina-Citosina, se encuentran dentro de ella. El diámetro de la hélice es de 20°A (2×10^{-7} mm). La estructura helicoidal repite a intervalos de 34°A o cada 10 pares de bases. Debido a la relación especial fija de las bases nitrogenadas dentro de la doble hélice y enfrentadas entre sí, las dos cadenas de la doble hélice son exactamente complementarias (Figura 8; Passerge, 2001).

Figura 8. Estructura del ADN (Passerge 2001).





VII. FRAGMENTACIÓN DE ADN EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Dado que la transmisión de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al ovocito es esencial para la consecución y desarrollo del embarazo, su rotura podría conllevar alteraciones en la fertilización y desarrollo embrionario. Por ello, en los últimos años también se está proponiendo como causa probable de esterilidad el daño del ADN espermático, y de ahí el interés en desarrollar técnicas analíticas encaminadas a medir la fragmentación del ADN espermático, e incluirlas en el estudio del factor masculino (Morales *et. al.*, 2007).

a) Calidad seminal y fragmentación de ADN espermático

La estructura del ADN es de gran utilidad para evaluarla calidad del esperma. La acumulación de pruebas muestra que ADN fragmentado podría ser un indicio de infertilidad masculina independientemente de la concentración espermática, motilidad y morfología (Evenson *et. al.*, 2002; 1999).

En humanos, se ha encontrado una estrecha asociación entre parámetros seminales anormales y roturas en el ADN nuclear de los espermatozoides del eyaculado. La fragmentación del material genético del espermatozoide es mayor en pacientes diagnosticados de oligoteratoastenozoospermia (Huang *et. al.*, 2005; Zini *et. al.*, 2001; Irvine *et. al.*, 2000;). Huang y colaboradores en el 2005 evaluaron este fenómeno usando el ensayo TUNEL y encontraron que el índice de fragmentación del ADN (DFI) era significativamente mayor en pacientes con parámetros seminales anormales.

Gandini y colaboradores en el 2000 estudiaron la relación entre apoptosis y fragmentación en donde demostraron una relación, además de una disminución de la concentración espermática y motilidad. Esta correlación se observó también con la morfología; los gametos que mostraban roturas en su ADN presentaban cabezas pequeñas y amorfas.

A diferencia de ellos, los datos obtenidos por Larson-Cook, en el 2003, mostraron que el DFI no siempre estaba relacionado con los parámetros seminales. Sólo un 30% de los varones con un DFI superior al 27% presentaban astenozoospermia y/o oligozoospermia.

A pesar de que en la mayoría de los casos la fragmentación se relaciona con anomalías seminales, es muy importante destacar que el 8% de los varones con parámetros seminales normales (esterilidad de origen desconocida) también presentan fragmentación en su ADN (Morales *et. al.*, 2007).

Por otra parte, los hombres con parámetros espermáticos anormales presentan mayor probabilidad a presentar muestras con mayor porcentaje de espermatozoides con daño en el ADN que los hombres que presentan parámetros seminales normales. (Agarwal y Said, 2003; Sakkas *et. al.*, 2003; Ollero *et. al.*, 2001; Irvine *et. al.*, 2000; Lopes *et al.*, 1998).

La determinación de la fragmentación del ADN de esperma, puede ser de gran valor en la evaluación de la fecundidad potencial de espermatozoides en vivo (Spano *et. al.*, 2000; Evenson *et.*



al., 1999), después de la inseminación intrauterina (IA), (Bungum *et. al.*, 2004; Duran *et. al.*, 2002), fertilización *in Vitro* (IVF), (Henkel *et. al.*, 2004; Sun *et. al.*, 1997), o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), (Virro *et. al.*, 2004; Lopes *et. al.*, 1998).

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 (Sergerie *et. al.*, 2005; Saleh *et. al.*, 2002), y se ha intentado establecer un punto de corte por encima del cual el pronóstico sería desfavorable (Morales *et. al.*, 2007).

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 (Spanó *et. al.*, 2000; Evenson *et. al.*, 1999). Ambos demostraron que un DFI superior al 30-40% es incompatible con la fertilidad *in vivo*, independientemente de la concentración, motilidad y morfología espermática (Morales *et. al.*, 2007).

Evenson y colaboradores, en el 2002, establecieron cuatro categorías para el potencial fertilizante del espermatozoide según el DFI:

- 1) Excelente si DFI < 15%
- 2) Alto si DFI 15-24%
- 3) Bajo si DFI 25-30%
- 4) Muy bajo si DFI > 30%.

Previamente Aravindan y colaboradores, en 1997, habían establecido una correlación significativa entre las técnicas SCSA, COMET y TUNEL para espermatozoides humanos; por tanto los datos obtenidos mediante una técnica se podrían comparar con los obtenidos por las otras dos. Recientemente, Sergerie y colaboradores, en 2004, mediante el TUNEL hallaron prácticamente los mismos puntos de corte que Evenson y colaboradores en 2002. Para ello, midieron la fragmentación del ADN espermático en un grupo de 66 hombres infértiles (40.9 ± 14.3) y 47 hombres fértiles (13.1 ± 7.3) y establecieron un punto de corte del 20%. Chohan y colaboradores en 2006, llegaron a la misma conclusión comparando un grupo de 60 hombres infértiles con un grupo de 7 donantes mediante las técnicas de SCSA, TUNEL y SCD.

b) Relación entre fragmentación del ADN en el espermatozoide 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 y colaboradores en 2003, Morris y colaboradores en 2002 y Sakkas y colaboradores en 1999 observaron que ambos parámetros no estaban relacionados. Sin embargo otros autores como Saleh y colaboradores en 2003, Lopes y colaboradores en 1998, y Sun y colaboradores en 1997, demostraron una correlación negativa entre fragmentación del ADN y tasa de fertilización tras FIV/ICSI. Virro y colaboradores en 2004 encontraron una relación entre índice de fragmentación en el ADN con la técnica SCSA en relación a los resultados de FIV/ICSI. Las tasas de fertilización con FIV/ICSI no fueron estadísticamente significativas entre grupos con alto y bajo DFI.



En el 2004, Henkel y colaboradores usando la técnica del TUNEL tampoco encontraron correlación entre el DFI y la tasa de fertilización en ciclos de FIV/ICSI.

Un estudio realizado en el 2002 por Duran en el cual se mide la fragmentación de ADN por las pruebas de TUNEL encuentran que los resultados de las TRA muestra una disminución significativa en la tasa de gestación en pacientes que presentan un alto índice de fragmentación.

En el caso de la fecundación *in vitro*, se presenta una correlación positiva (Liu *et al.*, 1992) ya que se encontró que espermatozoides que atraviesan la zona pelucida presentan menor grado de fragmentación de ADN lo que podría indicar que esta zona selecciona espermatozoides maduros con núcleo normal (Morris *et al.*, 2002), lo anterior se omite en el ICSI (Shamsi *et al.*, 2008).

c) ADN espermático y gestación natural

Hay 2 trabajos que muestran la relación entre daño en el ADN del espermatozoide, determinado mediante la técnica del SCSA y la capacidad de una pareja para concebir (Spanó *et al.*, 2000; Evenson *et al.*, 1999;). En el estudio de Evenson y colaboradores, 1999, se incluyó a 200 parejas con deseo gestacional. Se detectó que la dificultad para concebir se daba en varones que presentaban lesiones en el ADN ≥ 30 %, (Evenson *et al.*, 1999) mientras que en otro estudio realizado por Spanó *et al.*, 2000 se evidenció que cuando el daño en el ADN es >20 %, se observa una disminución de la fertilidad. Cuando el grado de lesión en el ADN sobrepasa el 40 %, la probabilidad de conseguir un embarazo es mínima (Spanó *et al.*, 2000).

d) Lesión en el ADN espermático y fecundación *in vitro* (FIV)

Existen numerosos estudios que muestran que los daños en el ADN espermático afectan a la fertilización y al embarazo tras la realización de una FIV. Sun y colaboradores, en 1997, determinaron la fragmentación del ADN espermático y encontraron que el 40 % de los espermatozoides obtenidos de muestras seminales, procedentes de la consulta de esterilidad, contenía dichas fragmentaciones. Asimismo, en la FIV observaron una correlación inversa entre el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN y el índice de fertilización e implantación (Sun *et al.*, 1997) El grado del daño del ADN espermático podría ser un índice predictivo del éxito en la FIV. Henkel y colaboradores en 2003, han comunicado que, aunque la fragmentación del ADN no muestra una correlación con el índice de fertilización ni con la fragmentación del embrión, la tasa de gestaciones en la FIV es significativamente más baja cuando los espermatozoides valorados eran positivos para la prueba TUNEL (>36 % espermatozoides positivos). Estos estudios apoyan los hallazgos de Twigg y colaboradores en 1998a, quienes informaron que un espermatozoide con el ADN dañado puede fertilizar un oocito mediante FIV o inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) y formar un pronúcleo. Sin embargo, dependiendo del grado de alteración del ADN, el desarrollo embrionario resulta afectado en fases posteriores, y en situaciones severas puede conducir a la muerte del embrión (Twigg *et al.*, 1998b).



e) Daño del ADN espermático e ICSI

El daño del ADN espermático, valorado mediante TUNEL, se relaciona inversamente con la tasa de fertilización en la ICSI. Lopes y colaboradores en 1998, encontraron que la proporción de espermatozoides con fragmentación del ADN influye en la tasa de fecundación e implantación de los embriones obtenidos mediante ICSI y la sitúa cerca del 10 %. No se originó ningún embarazo si había más de un 20 % de espermatozoides recuperados positivos para TUNEL, lo que sugiere que el daño del ADN puede tener un buen valor predictivo en los casos de fallo recidivante en la implantación de embriones de buena calidad.

Mediante la técnica SCSA se puede predecir la falta de embarazo cuando los espermatozoides recuperados muestran un desnaturalización del ADN ácido-inducido ≥ 27 % de IDF (Evenson *et. al.*, 2006) Sin embargo, en algunos estudios no se ha observado el efecto negativo de los espermatozoides con ADN defectuoso en la fecundación y el embarazo. Autores como Hammadeh y colaboradores en 2001, no encontraron diferencias significativas en los índices de fertilización, implantación y embarazo en pacientes a los que se les realizaba ICSI con diferentes grados de descondensación nuclear espermática.

Recientemente se ha publicado que el grado de fragmentación del ADN espermático y su estabilidad, pueden predecir el éxito en el recurso de inseminaciones artificiales intrauterinas. Los autores refirieron que el grado de fragmentación del ADN después de la preparación espermática era significativamente inferior en las muestras que obtuvieron el embarazo, en relación con las que no lo lograron. Así mismo no se consiguieron embarazos en las pacientes en las que se utilizaron muestras con >12 % de los espermatozoides con el ADN fragmentado (Duran *et. al.*, 2002).

f) Significación clínica del estudio de lesiones al ADN espermático

El espermiograma convencional no es útil en los pacientes con infertilidad idiopática. En las técnicas de reproducción asistida los parámetros seminales clásicos no tienen mayor importancia. Las técnicas de reproducción asistida impiden los mecanismos de selección espermática natural y permiten incrementar las posibilidades de que un espermatozoide con material genómico alterado pueda fertilizar un oocito. Las circunstancias obligan al desarrollo de otros métodos para evaluar la calidad espermática, como es el caso del estudio del daño del ADN espermático, procedimiento que adquiere una mayor relevancia ya que en la actualidad se dispone de mayor información, que lo relaciona con las técnicas de reproducción asistida y con el embarazo natural. La mayoría de los estudios muestran una correlación inversa entre el daño del ADN espermático y el índice de fertilidad y revelan una relación entre los índices de embarazo y la fragmentación del ADN. Esto indica la habilidad del embrión en utilizar determinados mecanismos para evitar la transmisión de anomalías en el material genómico (Gutiérrez, 2007).

g) 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 (Seli *et. al.*, 2004).

El efecto paterno a veces es aparente ya en el estadio embrionario de pronúcleos (efecto paterno temprano) se ha sugerido que puede deberse a una deficiencia de factores activadores del ovocito (Tesarik *et. al.*, 2002), o a un elevado nivel de fragmentación que pueda exceder la capacidad reparadora del mismo. 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 Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) (Benchaib *et. al.*, 2003; Host *et. al.*, 2002; Morris *et. al.*, 2002; Larson *et. al.*, 2000) 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 y colaboradores, en 2004, 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 mediante TUNEL (tras capacitación por swim up) es un buen método diagnóstico para revelar la causa paterna de los repetidos fallos de implantación en ICSI con embriones de buena calidad morfológica.

En el 2005, Sergerie y colaboradores encontraron que pacientes infértiles tenían un mayor nivel de fragmentación de ADN en comparación con hombres de fertilidad comprobada, con valores de $40,9 \pm 14,3\%$ frente a $13,1 \pm 7,3\%$, respectivamente ($P < 0,001$) utilizando la técnica de TUNEL.

h) Relación entre fragmentación de ADN y edad

Se conoce mucho sobre la disminución de la fertilidad con la edad de la mujer, pero todavía se está estudiando si la edad paterna afecta a la fertilidad en el mismo grado. Algunos estudios han demostrado que no existe correlación entre edad del varón y tasas de embarazo después de TRA (Erenpreiss *et. al.*, 2006; Aitken *et. al.*, 2001;), sin embargo, otros han demostrado lo contrario (Evenson *et. al.*, 1999; Sakkas *et. al.*, 1999).

La calidad del semen es la principal medida de la fertilidad del varón. Existen trabajos que defienden una disminución de los parámetros seminales convencionales con la edad (Andolz *et. al.*, 1999; Homonnai *et. al.*, 1982).

Recientemente, se está usando la fragmentación del ADN espermático como marcador de fertilidad masculina y también se está investigando su relación con la edad del varón. Diversos autores (Morris *et al.* 2002; Singh *et al.*, 2003; Trisini *et. al.*, 2004) observaron que usando la técnica del cometa que la fragmentación aumentaba con la edad, pero Benchaib y colaboradores en el 2003, no observaron correlación entre ambos parámetros mediante la técnica TUNEL.

Recientemente Moskovtsev y colaboradores en el 2006, mediante SCSA analizaron la fragmentación junto con otros parámetros seminales en grupos de varones de diferentes edades. Cuando las muestras del grupo de varones mayores de 45 años se compararon con aquellas de otros grupos se observó una diferencia significativa en tres parámetros: motilidad, vitalidad y DFI.



Los varones de 45 años o mayores presentan menor motilidad espermática que los varones más jóvenes, mientras que el DFI era significativamente mayor. El DFI en el grupo de mayor edad era superior al 30%, lo cual se corresponde con un bajo potencial fertilizante, sin embargo en los grupos de varones más jóvenes el DFI estaba por debajo de ese valor (del 15% al 30%) (Moskovtsev *et. al.*, 2006).

Toda esta información conlleva a que se requiere del análisis de semen y de fragmentación en aquellos pacientes que presentan problemas de infertilidad. Se tiene información por diversos autores (Bechaib *et. al.*, 2007; Carrell *et. al.*, 2003; Larson *et. al.*, 2003; Saleh *et. al.*, 2003 y Larson *et. al.*, 2000; y), pero todos ellos son realizados en poblaciones diferentes a la latina y en caso concreto a la Mexicana.

i) Fragmentación de ADN y criopreservación

La congelación de semen es la técnica que nos permite conservar espermatozoides a bajas temperaturas (-196°C) y mantenerlo durante largos periodos sin pérdida de su capacidad fecundante (Remohí *et. al.*, 2008).

La congelación está especialmente indicada en pacientes que van a someterse a vasectomías, tratamientos con quimioterapia o radioterapia, así como en aquellos pacientes que por diversa razones presentan dificultades para obtener un eyaculado normal (disfunción eréctil, eyaculación retrógrada), o muy mala calidad espermática (oligozoospermia grave y criptozoospermia) (Remohí *et. al.*, 2008).

Existen otras situaciones en las que sería recomendable, como en el caso de pacientes que se encuentran en el programa de donación de ovocitos y de profesionales que viajen frecuentemente, siendo en ocasiones difícil poder coordinar el momento en que se requiere su presencia física con el momento en que se deberá utilizar la muestra. En general, se puede decir que no existen criterios de selección de muestra para congelación, salvo en el caso de los donantes de semen (Remohí *et. al.*, 2008).

Hay que tener en cuenta que el proceso de descongelación afecta la calidad espermática, sobre todo la motilidad. No hay parámetros espermáticos de análisis inicial que nos permitan correlacionar positivamente con la supervivencia espermática; por ejemplo, a mayor cantidad de espermatozoides móviles por dosis no se obtiene mejor resultado tras la descongelación. Hay que señalar también que las muestras pueden sufrir alteraciones durante el periodo de almacenamiento, que se puede traducir en una supervivencia nula después de la descongelación. Por ello, es necesario utilizar para la congelación sustancias y medios que protejan al máximo a los espermatozoides del daño que pueda causar las bajas temperaturas: medios crioprotectores. Asimismo, la muestra debe conservarse en recipientes adecuados para mantenerla en óptimas condiciones (Remohí *et. al.*, 2008).



Medios crioprotectores

Los medios crioprotectores están constituidos por componentes ácidos, básicos y nutrientes que aportan energía a las células espermáticas, debiendo ser, además, soluciones isosmóticas en el plasma seminal de semejante fuerza iónica, capacidad tampón y pH cercano a la neutralidad (Sakkas *et al.*, 2000).

Los crioprotectores pueden ser de dos tipos:

Penetrantes

Son aquellos que entran en la célula y desplazan el agua que hay en ellas ocupando su lugar, evitando así la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación lenta. Son de este tipo el metanol, glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, etc. (Remohí *et al.*, 2008).

No penetrantes

Son los que actúan rodeando la membrana plasmática, de modo que induce la formación de cristales alrededor de la misma, protegiendo de esta manera a la célula. En este grupo se incluyen azúcares, lipoproteínas de la yema de huevo y proteínas de alto peso molecular. Los más empleados son los basados en glicerol y yema de huevo (Remohí *et al.*, 2008).

Efectos de la congelación de espermatozoides humanos

La criopreservación es ampliamente utilizada en la actualidad como un método de almacenar, diferentes tipos de células y tejidos incluidos los gametos masculinos y femeninos además de embriones. Desde fines del 1930-1940 (Polge *et al.*, 1949; Smirnov, 1949), ha sido posible criopreservar los espermatozoides de varias especies de mamíferos de manera eficaz, especialmente espermatozoides humanos. Este tipo de técnica tiene importantes aplicaciones, incluyendo la preservación de la fertilidad masculina antes de la radioterapia y / o quimioterapia (Sanger *et al.*, 1992), o cualquier otro padecimiento que puede conducir a falla testicular o disfunción eyaculatoria. Sin embargo, debido a los daños provocados por la congelación, la motilidad de los espermatozoides criopreservados tras la descongelación disminuye (Yoshida *et al.*, 1990; Critser *et al.*, 1988). A pesar de ello, no parece obstaculizar la fertilización y o la tasa de embarazo en técnicas de Reproducción Asistida (Hammadeh *et al.*, 2001; Kuczynski *et al.* 2001).

En el 2004, Isachenko y colaboradores realizaron estudios en donde encuentran una correlación negativa entre daño de ADN en los espermatozoides tras la criopreservación.

En el 2001 Hammadeh y colaboradores encontraron que el medio TEST-Yolk Buffer presenta más bondades en comparación al HSPM para criopreservar espermatozoides humanos, ya que el primero presenta mejores resultados en relación a la integridad estructural de la cromatina y la morfología espermática.

En un estudio realizado por Donnelly y colaboradores, en el 2001, encontraron que hombres fértiles no se ven afectados por la criopreservación, por el contrario, los espermatozoides de los hombres infértiles fueron significativamente dañados por congelación-descongelación, analizándose



con test de fragmentación del cometa y congelados con nitrógeno líquido a -196° C. En relación a la morfología se presentó un efecto perjudicial sobre esta en los dos casos.

Duru y colaboradores, en 2001, realizaron un estudio en el que se revela que espermatozoides pre y post congelación no difieren en valores en relación a la fragmentación de ADN. Estos resultados se obtuvieron mediante el test de fragmentación TUNEL.

En diversos trabajos se propone que la generación excesiva de ROS y la peroxidación son los responsables de la reducción de la motilidad de los espermatozoides procedentes de semen criopreservado (Wang *et. al.*, 1999).

j) Reducción de la fragmentación del ADN espermático

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 (Morales *et. al.*, 2007).

En el estudio de Greco y colaboradores en 2005a, 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 clínico (Morales *et. al.*, 2007).

Espermatozoides del testículo

Algunos estudios han sugerido que el daño en el ADN espermático puede ocurrir a nivel post-testicular. Greco y colaboradores en 2005b, realizaron un trabajo para demostrar la ventaja de usar espermatozoides de testículo en estos casos. El porcentaje de fragmentación fue significativamente inferior en espermatozoides testiculares en comparación con espermatozoides del eyaculado. No se observaron diferencias en tasas de fertilización e implantación ni en morfología embrionaria entre los ciclos ICSI realizados con espermatozoides del eyaculado o del testículo. Sin embargo, con espermatozoides testiculares se obtuvieron ocho embarazos clínicos mientras que con espermatozoides del eyaculado sólo se logró un embarazo que finalizó en aborto espontáneo. Estos datos demostraron que un ciclo ICSI con espermatozoides testiculares es una opción eficaz para varones con alto nivel de fragmentación en el ADN espermático, de causa posttesticular.



VIII. MECANISMOS DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LOS ESPERMATOZOIDES

El origen de las lesiones en el ADN del espermatozoide puede deberse a múltiples causas como son: la presencia de una enfermedad, el uso de fármacos, fiebre alta, temperatura testicular elevada, contaminación atmosférica, tabaquismo, varicoceles, factores hormonales, o una edad avanzada. El mecanismo molecular implicado en estas lesiones se encuentra aún bajo intensa investigación. Los principales mecanismos en consideración son el empaquetamiento anormal del ADN espermático durante el proceso de espermatogénesis (Cho *et. al.*, 2003; Carrell *et. al.*, 2001), la apoptosis abortiva (Singh *et. al.*, 2003; Brinkworth y Nieschlag, 2000) y la presencia o acción sobre el ADN de las especies reactivas de oxígeno (Smith y *et. al.*, 2006; Irving *et. al.*, 2000).

Se han propuesto cuatro posibles vías o mecanismos para la producción de la fragmentación de ADN en los espermatozoides y son 1) alteraciones durante el proceso de la espermiogénesis, 2) inducción de apoptosis durante el proceso de espermiogénesis, 3) inducción del daño de ADN en espermatozoides diferenciados maduros por espermatozoides inmaduros que producen niveles elevados de radicales libres (ROS) y 4) activación de caspasa y endonucleasas en espermatozoides diferenciado por factores físico-químicos.

1) Alteraciones durante el proceso de espermiogénesis.

El empaquetamiento del núcleo espermático ocurre durante la espermiogénesis y es diferente al que ocurre en las células somáticas: la mayoría de las histonas que son las proteínas encargadas del empaquetamiento de la cromatina en las células somáticas, son removidas y sustituidas con proteínas de transición (TP1 y TP2), las cuales son reemplazadas posteriormente por proteínas nucleares denominadas protaminas (P1 y P2) (Agarwal, 2003; Fuentes *et. al.*, 2000). Adicionalmente, en este estadio y en la maduración epididimal se forman puentes disulfuro entre estos residuos proteicos, lo que hace al ADN unas seis veces más compacto, con un volumen 40 veces menor que el de una célula somática e implica un espermatozoide transcripcionalmente inactivo. Este empaquetamiento le permite al núcleo espermático tener una estabilidad adicional que es necesaria para asegurar el transporte y la integridad del material genético masculino durante su desplazamiento en el tracto reproductivo femenino (Agarwal, 2003; Wykes *et. al.*, 2003) la cromatina del espermatozoide requiere la actividad de nucleasas endógenas que corten y ligen el ADN durante su protaminación. Estos cortes proporcionan una liberación de estrés torsional ayudando así al empaquetamiento de la cromatina durante el desplazamiento de las histonas por las protaminas. (McPherson y Longo, 1993). Alteraciones en el control de estos procesos podría concluir con roturas de ADN no reparadas. Estas alteraciones se producirán antes de la espermiación (Gutiérrez, 2007).

La apoptosis controla las alteraciones en este proceso que podrían ocasionar defectos en el remodelado de la cromatina y fragmentación de ADN en los espermatozoides. McPherson y colaboradores en 1993 postularon que la presencia de roturas en el ADN podría ser indicativa de maduración incompleta durante la espermatogénesis. Para que se produzca el empaquetamiento debe haber una superproducción de gametos masculinos y restringe los niveles normales de proliferación para que no sobrepasen la capacidad de apoyo de las células de Sertoli. La apoptosis de células germinales ocurre en los testículos durante la espermatogénesis, y da como resultado la



activación de endonucleasas. Esto ocurre predominantemente en la espermatogonia y en las células en división, y genera numerosas roturas en el ADN dentro de la cromatina (Gutiérrez, 2007).

La evidencia sugiere que la apoptosis ocurre en muchos hombres que exhiben parámetros espermáticos anormales. En ciertos hombres la apoptosis abortiva puede fallar en la separación de los espermatozoides enmarcados para eliminar por esta vía. Por lo tanto, la subsiguiente población de espermatozoides puede presentar anomalías, representativas de células en apoptosis (Gutiérrez, 2007).

2) Inducción de apoptosis durante el proceso de espermiogénesis.

Como ya se ha demostrado previamente, un porcentaje variable de espermatozoides en el eyaculado presentan marcadores de apoptóticos (por ejemplo Fas, un marcador apoptótico). La presencia de Fas en los espermatozoides se correlaciona con una disminución de la concentración y la presencia de formas anormales. Más recientemente, se ha identificado otros marcadores apoptóticos como Bcl-XL, p53 y Anexina V (Sakkas *et. al.*, 1999; Billing *et. al.*, 1996).

3) Inducción del daño de ADN en espermatozoides diferenciados maduros por espermatozoides inmaduros que producen niveles elevados de radicales libres (ROS)

Este daño se produciría después de la espermiación durante la comigración de espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos al epidídimo (Ollero *et. al.*, 2001). Dado que los espermatozoides se encuentran en íntimo contacto con los túbulos seminíferos y el epidídimo, y que la vida media de los ROS es del orden de nano a microsegundos, esto facilitaría el daño que los ROS podrían ejercer, ya sea directa o indirectamente (activación de endonucleasas) en el ADN de los espermatozoides.

Esto está en sintonía con el hecho de que la co-centrifugación de espermatozoides inmaduros (que supone niveles elevados de ROS) con espermatozoides maduros ocasiona la inducción de fragmentación de ADN en estos últimos, ya que en estas condiciones estos espermatozoides también se encontrarían en íntimo contacto (Twigg, 1998a).

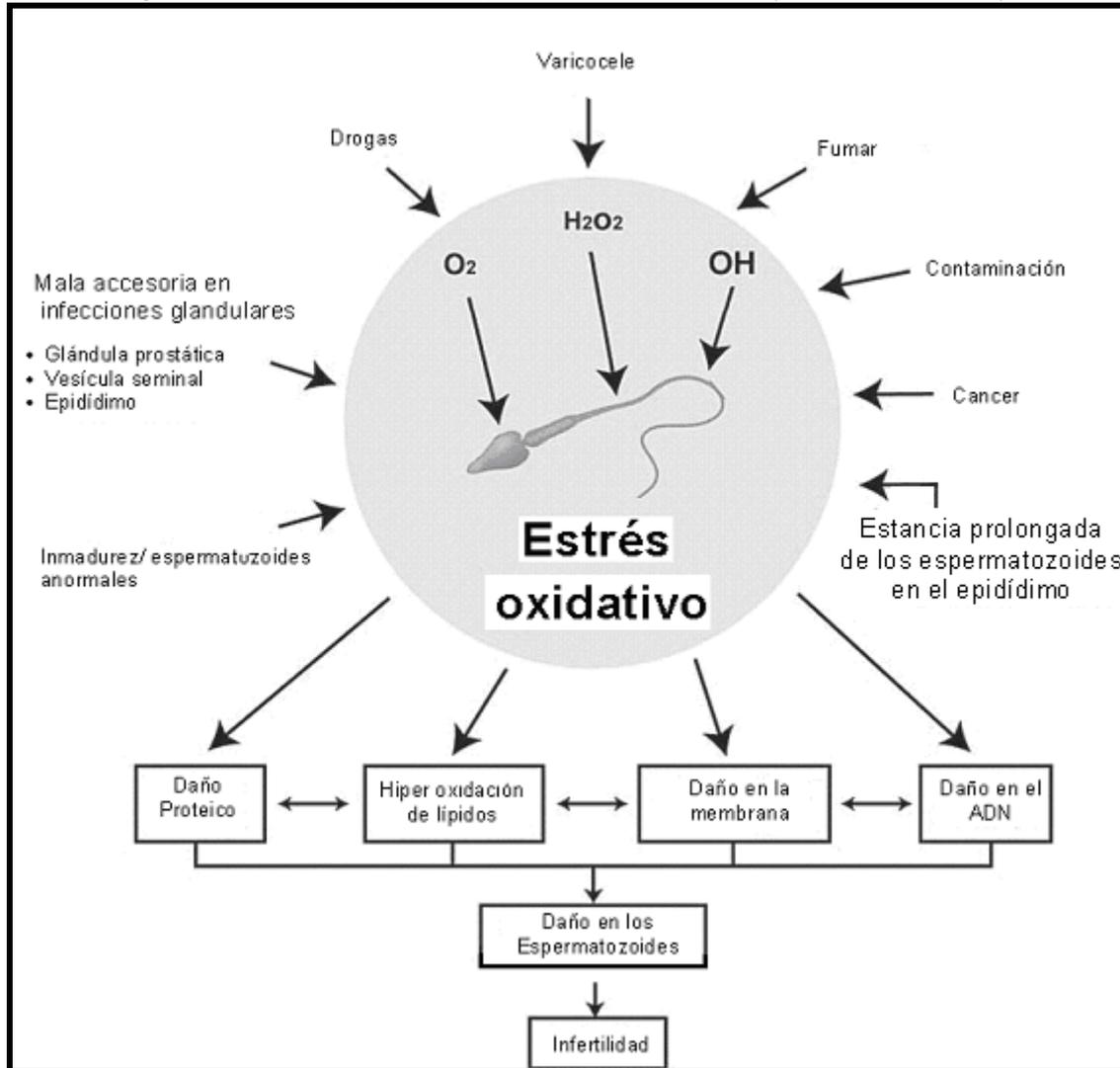
La producción de ROS en los espermatozoides es un proceso fisiológico natural. A concentraciones bajas estas moléculas tienen un papel fisiológico, pero en exceso provocan daño celular que puede afectar a la fertilidad humana. Esta concentración en exceso de ROS puede ser debida a causas endógenas (excesiva producción o deficiente funcionamiento de los sistemas antioxidantes) o/y exógenas (factores ambientales) (Figura 10; Cocuzza *et. al.*, 2007).

La presencia de radicales libres de oxígeno ha merecido una atención especial, tanto por su papel en la fisiología como por su implicación en las enfermedades de la reproducción humana (Agarwal *et. al.*, 2003).

La presencia de estrés oxidativo tiene lugar cuando hay una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno por parte de los leucocitos, o por los espermatozoides anormales, y/o se

produce una disminución de la capacidad antioxidante del semen. En diversos estudios se ha descrito que la presencia de radicales libres de oxígeno es una causa importante de lesión en el ADN del espermatozoide (Moustafa *et. al.*, 2004; Barroso *et. al.*, 2000; Irving *et. al.* 2000;).

Figura 10. Factores que pueden producir estrés oxidativo (Cocuzza *et. al.*, 2007).



4) Activación de caspasa y endonucleasas

Estudios previos indican que la exposición de espermatozoides de ratón *in vitro* a 40°C ocasiona un aumento significativo en el grado de fragmentación de ADN, esto se puede correlacionar con un desequilibrio en los procesos naturales de las caspasas y endonucleasas (Sailer, 1995).



IX MÉTODOS PARA DETERMINAR DE FRAGMENTACIÓN DE ADN

Aunque el análisis del semen constituye un pilar esencial para la evaluación de la esterilidad, en muchos casos no permite detectar la presencia de alteraciones sutiles en el espermatozoide. Se considera que aproximadamente un 15% de los varones estériles presenta un espermiograma dentro la más completa normalidad (Guzick *et. al.*, 1998).

Es posible que los parámetros sistemáticos del semen no siempre sean indicativos de la calidad de la ADN del espermatozoide. Los pacientes pueden tener espermiogramas normales y seguir siendo estériles. La causa de la infertilidad puede ser debida a la presencia de un ADN anómalo espermático, factor que no se mide de forma sistemática. La integridad del ADN en el espermatozoide se puede considerar como un parámetro independiente e indicativo de la calidad de éste (Agarwal y Allamaneni, 2005).

Recientemente se ha introducido una serie de tests para la determinación de daño de ADN en los espermatozoides. Estos tests incluyen, *TdT-mediated-Dutp Nick-End Labelling* (TUNEL) (Gorczyac *et. al.*, 1993), COMETA (Hughes *et. al.*, 1996), CMA₃ (Manicardi, 1995), *insitu nick traslation* (Tomlinson, 2001), DBD_FISH (DNA Breakage Detection Fluorecence In Situ Hybridization o detección de roturas en el ADN por hibridación *in situ*) (Fernández *et. al.*, 2000; Fernández *et. al.*, 1998), *Sperm Chromatin Dispersión Test* (SCD) (Fernández *et. al.*, 2003) y el *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) (Everson, 1999; Everson, 1980).

Cabe distinguir dos grupos principales: test que mide daño de cadena sencilla y susceptibilidad a la desnaturalización del ADN *in vitro*, como el test SCSA, SCD, DBD-FISH, COMET Y CMA (McPherson y Longo, 1993); test que mide daño de cadena doble y daño real de fragmentación de ADN, como TUNEL e *in situ nick translation Test* SDC (Álvarez, 2005).

En la tabla 7 se muestran las características de cada uno de los análisis que determinan fragmentación de ADN.



Tabla 7.- Resumen de las metodologías utilizadas para evaluar alteraciones en el ADN de espermatozoides, así como de algunas de sus ventajas e inconvenientes en relación con la aplicación clínica de rutina (Cortés *et. al.*, 2007).

MÉTODO	INSTRUMENTAL	VENTAJAS	DESVENTAJAS	UTILIDAD CLÍNICA	FUNDAMENTO
Metodologías que se basan en el marcaje de roturas del DNA					
TUNEL	Microscopio Fluorescencia Citometría de Flujo	Cumple con parámetros de control de calidad	Equipo sofisticado y costoso	Fertilidad masculina Reproducción asistida Pérdida fetal	Permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados con los extremos de las roturas existentes del ADN, bien sea de cadena sencilla o doble.
ISNT	Microscopio Fluorescencia Citometría de Flujo	Reacción de marcaje directo	Equipo sofisticado y costoso	Fertilidad masculina	Esta técnica se basa en la evaluación de la fragmentación tras la incorporación de moléculas de dUTP modificado con botina o digoxigenina, o bien marcado directamente el ADN con un fluorocromo conjugado con un nucleótido modificado, tras utilizar la enzima ADN polimerasa I.
Metodologías que se basan en la susceptibilidad del ADN para desnaturalizarse					
SCSA	Citometría de flujo	Punto de corte establecido (30%)	Instrumentación costosa Recomendada en estudios para diferenciar pacientes fértiles	Epidemiológico Infertilidad	Basada en la utilización de la citometría de flujo y en las propiedades metacromáticas de la sustancia fluorescente naranja de acridina.
COMETA	Microscopio Fluorescencia	Bajo costo	Lento de ejecución Requiere observador con experiencia	Fertilidad masculina Reproducción asistida experiencia Criopreservación de esperma	El ADN de un núcleo desproteínizado que contenga roturas en sus cadenas de ADN, estará más libre para ser movilizado hacia el polo positivo, cuando éste se someta a un campo eléctrico ⁵ .
SCD	Microscopio Fluorescencia campo claro	Análisis simple de resultados Bajo costo	Aún no determinada	Aún no determinada Varicocele?	Consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto.
DBD-FISH	Microscopio Fluorescencia	Revela modificaciones	Procedimiento sofisticado y costoso	Aún no determinad	Basado en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas o bien ácidas suaves,



estructurales
de la cromatina.

de producir desnaturalización en la molécula de ADN utilizando los extremos generados por roturas en las cadenas.

Otros métodos

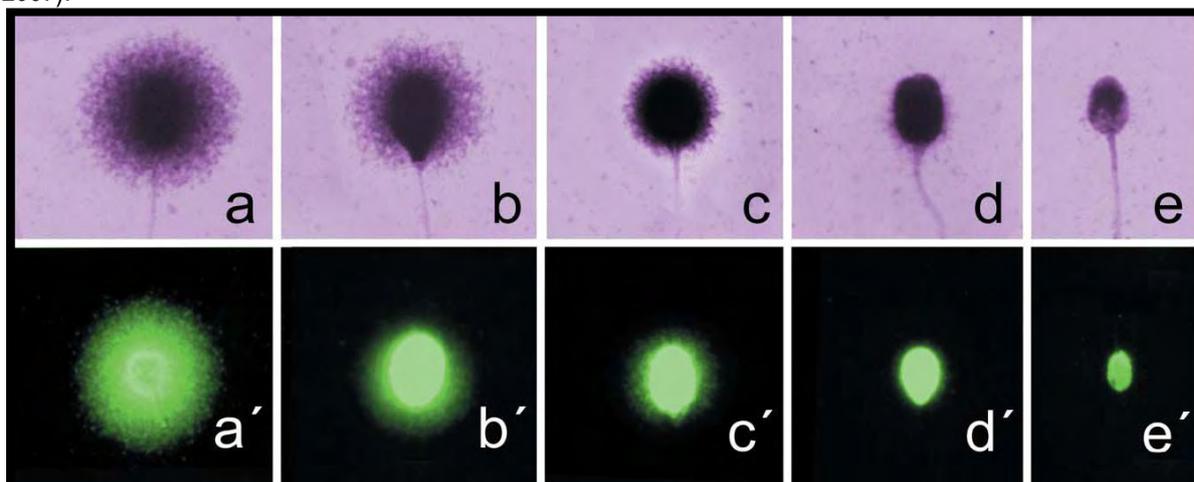
NA	Microscopio Fluorescencia campo claro	Bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Diferencias significativas en patologías andrológicas	Utilizando las propiedades metacromáticas de la naranja de acridina, algunos investigadores han aplicado el mismo principio que el utilizado en el SCSA para visualizar los espermatozoides con ADN fragmentado empleando microscopía defluorescencia
AT	Microscopio campo claro	Método simple bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Evaluación de anomalía en la cromatina.	El azul de Toluidina es un colorante nuclear básico que genera reacciones metacromáticas cuando interacciona con la cromatina
CMA	Microscopio Fluorescencia	Método simple bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Evaluación de anomalía en la cromatina	La Cromomicina A3 es un fluorocromo ampliamente utilizado en citogenética debido a que produce una buena diferenciación longitudinal de los cromosomas, ya que se ancla específicamente a regiones ricas en guanina-citosina y compete por los mismos lugares en el ADN, que las portaminas.

TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labeling. ISNT = In situ Nick Translation. DBD-FISH: DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization. SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay. SCD: Sperm Chromatin Dispersion. NA: Naranja de Acridina. AT= Azul de Toluidina. CMA: Cromomicina A3.

a) Test SCD.

El test SCD está basado en el hecho de que en espermatozoide con la cadena de ADN intacta se produce un desenrollamiento de los bucles de ADN, empaquetados en la matriz nuclear, tras haber sido expuestos a un tratamiento ácido, seguido de un tratamiento con agentes reductores y detergentes. Este desenrollamiento produce un halo alrededor de la matriz nuclear (Figura 11) que se puede visualizar con microscopía de campo claro usando tinciones con el *Diff- Quik*. Por el contrario, si una de las cadenas de ADN está dañada, no se produce el halo, observándose núcleos condensados. Sin embargo los espermatozoides que se exponen al tratamiento ácido previo, producen el desenrollamiento de los bucles de ADN, independientemente de que el ADN esté fragmentado o no. (Álvarez, 2005).

Figura 11. Visualización de la integridad del ADN mediante el test SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*) y visualización en microscopía de campo claro (a-e; tinción: colorante de Wright) y microscopía de fluorescencia (a'-e': tinción SYBR-Green). Mientras que los espermatozoides etiquetados como a y b, tienen su ADN integro, el resto presentan ADN fragmentado (Cortés *et. al.*, 2007).



b) TEST SCSA

El test desarrollado por Everson y colaboradores, en 1980, mide la susceptibilidad de ADN de los espermatozoides a la desnaturalización *ni situ* tras la exposición a un pH ácido. El ADN de espermatozoide con una cromatina normal no se desnaturaliza, mientras que si el ADN de los espermatozoides está dañado y contiene roturas en su cadena pueden alcanzar diferentes grados de desnaturalización. Para determinar el grado de desnaturalización de ADN espermático, tras el tratamiento ácido, se tiñen las células con naranja de acridina (AO). Dado que el AO es un fluorocromo metacromático, éste emite en verde cuando se intercala en cadenas de ADN doble (ADN intacto) y en rojo si son de cadena sencilla (ADN fragmentado). El grado de daño de ADN, es decir la intensidad de la fluorescencia verde y /o roja en los espermatozoides se mide de forma cuantitativa por citometría de flujo y se expresa como DFI (*DNA Fragmentation Index*). (Everson, 1999; Everson. 1980)

Estudios previos indican que valores de DFI mayores de 27% están asociados con fallo de embarazo en TRA (Larson *et. al.*, 2003; Larson *et. al.*, 2000)



c) Ensayo TUNEL (*Terminal dUTP Nick-End Labeling*)

Esta prueba permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos de las roturas existentes en el ADN, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se cataliza, *in situ*, mediante la acción de una transferasa terminal. Esta enzima incorpora deoxiuridina modificada con biotina o digoxigenina, en el extremo 3'-OH de la cadena afectada. Posteriormente, los nucleótidos modificados se detectan tras una reacción con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo como molécula trazadora. El nucleótido incorporado puede estar directamente marcado con el fluorocromo. Teóricamente, la señal de marcado obtenida por cada espermatozoide, se incrementaría de acuerdo con el número de roturas que presente la cadena de ADN (Chohan *et. al.*, 2006; López *et. al.*, 1998).

d) Cromomicina A3 (CMA3)

La Cromomicina A3 es un fluorocromo ampliamente utilizado en citogenética debido a que produce una buena diferenciación longitudinal de los cromosomas, ya que se ancla específicamente a regiones ricas en guanina-citosina y compite por los mismos lugares en el ADN, que las protaminas. Por lo tanto, cuando los espermatozoides presentan una tinción intensa tras ser teñidos con CMA3, se interpreta que esta población celular muestra unos niveles bajos de protaminación.

Es decir, esta técnica revela espermatozoides que tienen un nivel deficiente de empaquetamiento en su cromatina, siendo también una prueba de maduración-condensación nuclear. De nuevo, una de las limitaciones más importantes de esta técnica es la subjetividad del observador a la hora de establecer los grupos de clasificación. No obstante, algunos estudios la muestran como una prueba de elección frente a la naranja de acridina, o derivados de la toluidina, para el análisis de la maduración nuclear del espermatozoide (Nasr-Esfahani, 2001).

e) DBD-FISH (*DNA Breakage Detection*)

Fluorescence In Situ Hybridization. Se trata de una metodología relativamente reciente y que se circunscribe al campo de la investigación. Se fundamenta en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas de producir una desnaturalización del ADN a partir de los extremos de roturas de doble cadena o de cadena sencilla, o bien lugares sensibles al álcali. Después de la desnaturalización y extracción de las proteínas utilizando una solución de lisis, el ADN generado de cadena sencilla, puede hibridarse con una sonda de ADN. Cuantas más roturas existan en dicha cadena, mayor será el nivel de marcado que se obtenga en el núcleo (Fernández *et. al.*, 2000). Al igual que las técnicas de TUNEL o ISNT, la técnica de DBD-FISH no se puede considerar de aplicación rutinaria por razones similares a las descritas previamente. Desde el punto de vista de la investigación, tiene mucho interés, ya que es la única técnica disponible que nos permite evaluar daño de célula a célula, *in situ*, en secuencias específicas del ADN (Fernández *et. al.*, 2000).



f) Ensayo del cometa

En realidad este ensayo es una adaptación de la electroforesis de ADN desnudo, comúnmente utilizada en biología molecular, al campo de la biología celular. La idea es que el ADN de un núcleo desproteinizado que contenga roturas en sus cadenas de ADN, estará mas libre para ser movilizado hacia el polo positivo, cuando éste se someta a un campo eléctrico (Aravindan y col., 1997). La metodología básica consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfidrilo que se encuentran en la protaminas del espermatozoide, como por ejemplo DTT (dithiothreitol). Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sustancias fluorescentes del tipo DAPI (4,6 diamidino 2-phenylindole), IP (Ioduro de Propidio) o SYBR-GREEN (Synergy Brand). De esta forma, el ADN fragmentado se desplaza generando una imagen similar a la de un cometa. Aquellos espermatozoides con su ADN integro no generan o sólo producen imágenes de discretas colas de cometa, mientras que aquellos núcleos que tienen su ADN dañado muestran un claro desplazamiento de los múltiples fragmentos de ADN (Singh *et. al.* ,1988).



JUSTIFICACIÓN

Se estima que en un 50 % de los casos de infertilidad se atribuyen al factor masculino, por lo que el estudio del varón infértil se inicia con un análisis de semen convencional orientado a infertilidad, dicho estudio proporciona información para determinar el tipo de etiología que presenta, pero no indica el potencia fecundante del semen y la posibilidad de lograr un embarazo. Por esta razón se requiere de mayor información que proporcione al médico una adecuada orientación en cuanto a estudios a realizarse en el varón (Morales *et al.*, 2007).

En la actualidad existen técnicas de vanguardia que permiten analizar el ADN de los espermatozoides en cuanto a posible daño en su material genético y con ello tener más alternativas de evaluación en la infertilidad masculina (Álvarez, 2007).

Estudios reportan que las muestras de semen que presentan altos niveles de fragmentación de ADN están con frecuencia asociadas a una disminución en la tasa de fertilización y puede estar asociada a una mala calidad embrionaria, bloqueo embrionario o aborto (Spanó *et. al.*, 2000).

Por esta razón, en el presente trabajo se pretende realizar un estudio para determinar el grado de fragmentación de ADN de los espermatozoides en pacientes de 1ª vez de consulta que presentan problemas de infertilidad previo a cualquier procedimiento de Reproducción Asistida. Con ello se intenta tener más información que permita una mayor probabilidad de embarazo.



HIPÓTESIS

Los pacientes masculinos mexicanos que presentan un problema de infertilidad, presentarán algún tipo de fragmentación en el ADN en los espermatozoides y este daño dependerá de la etiología que se presente en cada uno de los casos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el grado de fragmentación de ADN en espermatozoides criopreservados de pacientes que presenten un tipo de infertilidad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el grado de daño de ADN de los espermatozoides de pacientes que padecen de infertilidad masculina.
- Determinar si se presenta una relación entre la etiología y el grado de fragmentación presente en espermatozoide en pacientes Mexicanos.
- Determinar si el grado de la fragmentación de ADN se correlaciona con la morfología del espermatozoide.



MATERIALES Y MÉTODOS

a) Colecta de la muestra.

Las muestras fueron colectadas con un tiempo de abstinencia sexual de 48 a 72 horas, se colectaron por masturbación directamente en un envase de plástico estéril (etiquetados con los datos del paciente) en áreas especiales en la clínica. Una vez recogida la muestra, esta se mantuvo a una temperatura de 37°C para evitar una reducción en la movilidad hasta su análisis.

b) Seminograma.

Examen microscópico.

Licuefacción y viscosidad.

La muestra de semen normal se licuó aproximadamente en 15 minutos a temperatura ambiente pero, si transcurrido 60 minutos la muestra no completaba la licuefacción, se procedió de la siguiente manera: Se mezcló la muestra automáticamente ó se añadió medio y se pipetó repetidamente. Si embargo, se tuvo en cuenta que con estos procedimientos puede verse afectada la bioquímica del plasma seminal, movilidad y morfología espermática.

Aspecto.

El aspecto del semen se valoró por su color, opacidad/transparencia y presencia de cuerpos mucosos o gelatinosos. El semen humano es normalmente un líquido homogéneo opalescente de color blanquecino amarillento.

Volumen.

El volumen del semen se midió con pipeta graduada. Se tomó como referencia el volumen normal de dos mililitros o más según la WHO en el 1999. En volúmenes de semen bajo se denominó (hipospermia) o alto (hiperspermia).

pH.

El pH de la muestra licuada se midió con tiras de papel ColorpHast de Merck (Darmstadt, Alemania), con rango de sensibilidad de 6.4 a 8.0. Se colocó sobre la tira de papel una gota de semen; al cabo de 6 segundos, el color de la zona impregnada se observó uniforme y se comparó con la tira de calibración para leer el pH.

Examen microscópico.

Preparación de la muestra.

Todas las preparaciones de las muestras para el análisis de semen se realizaron en una campana de flujo laminar, hasta su análisis en el microscopio.

Concentración.

Se utilizó cámara Mackler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) (Figura 12). Esta cámara consta de una cuadrícula de 1mm² dividida en 100 cuadros, con una profundidad de 10µL. Se contaron un grupo de tres, se multiplicó por 10 y se dividió entre 3, estos cuadros corresponden a una concentración de millones por mililitro.



Figura 12. Imagen de cámara makler



Movilidad.

El análisis de movilidad de los espermatozoides de la muestra de semen se realizó con cámara Mackler, contando solamente los espermatozoides libres y nunca los que estaban agregados entre sí o a otras células. Se llevó a cabo el recuento de los espermatozoides móviles e inmóviles a varios campos seleccionando al azar y con un objetivo de 40 aumentos Ph2. Se contaron 100 espermatozoides. Primero se registraron los espermatozoides móviles progresivos del campo, para a continuación contar los móviles no progresivos y los inmóviles del mismo campo.

Los criterios de espermatozoides, en función de la velocidad de movimiento:

Móviles progresivos rápidos: Desplazamiento de forma rectilínea y rápida. (Tipo A)

Móviles progresivos lentos: Desplazamiento de forma más lenta y de manera rectilínea o en curva. (Tipo B)

Móviles no progresivos: Se mueven, pero no se desplazan. (Tipo C)

Inmóviles: No se mueven en lo absoluto. (Tipo D)

Vitalidad espermática.

Esta técnica se basa en el principio de que las células muertas, que por tanto presentaban alteraciones de la membrana plasmática, absorben determinada tinción, tal fue el caso de la eosina en donde el protocolo fue el siguiente:

Se preparó una solución de eosina al 0.5 % (5g/L) en una solución acuosa al 9 % (9g/L) en cloruro sódico. Se mezclaron 5 μ L de semen y de solución de eosina en un portaobjetos, al cual se le colocó un cubreobjetos de 22 X 22 mm para observar la preparación a 40 aumentos a Ph2. Los espermatozoides fueron contados como: no teñidos (vivos) y los teñidos (muertos) expresados en porcentaje.

Morfología espermática

El estudio de las características morfológicas se estudió en extensiones teñidas con Hemacolor. El protocolo fue el siguiente:

Se preparó una extensión con 5 μ L de semen y se dejó secar bien. Posteriormente se fijó la preparación con la primera solución durante 3 segundos. Para pasar durante 45 segundos y 1 minuto respectivamente en los colorantes. Finalmente se lavó en agua corriente. Se dejó secar a temperatura ambiente. Se contaron 100 espermatozoides con un objetivo de 100 aumentos a Ph 0 y aceite de inmersión.



c) Congelación

Proceso de congelación

Preparación de la muestra

Tras la recogida, se dejó durante 30-45 minutos hasta su completa licuefacción.

La muestra se concentró mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante hasta dejar el pellet diluido en un volumen de plasma aproximadamente 1mL. Así mismo, si el volumen de plasma era muy pequeño (<- 1 mL) la muestra no fue centrifugada.

Adición del crioprotector

Se añadió el crioprotector no penetrante de la marca TYB-glicerol, previamente atemperado, en proporción 1:1. Ha continuación se dejó a temperatura ambiente durante 25 minutos para posteriormente proceder a la congelación. Este tiempo se empleó en la rotulación o identificación del recipiente donde se conservó la muestra de semen.

Congelación de píldoras

En primer lugar se obtuvo la pastilla de hielo seco comprimido sobre la que se excavó unos pequeños pocillos. A continuación, con ayuda de una pipeta pasteur, se depositó pequeñas cantidades de la mezcla semen-crioprotector sobre los pocillos.

Envasado y almacenamiento

Cuando la gota perdió brillo y adquirió un color perla opalescente indicando que estaba lista para depositarlas dentro del crió tubo/gobelete, previamente introducido en un recipiente con nitrógeno líquido. El tubo, perfectamente identificado, se introdujo directamente en el tanque de nitrógeno líquido, donde quedó almacenado hasta el momento de su utilización a una temperatura de -196 ° C.

Descongelación

Se transfirió el contenido de las píldoras en un tubo Falcon de base redonda. Posteriormente, el tubo fue colocado en agua durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se introdujo el tubo en la incubadora a 37° C durante 10 minutos. Posteriormente se realizó el recuento de la muestra y se preparó para procedimiento de fragmentación.

d) Fragmentación de ADN

El análisis de fragmentación de ADN espermático se realizó mediante la técnica de SCD.

Inclusión de la muestra en microgel de agarosa

Se tomó un frasco con solución de lisis para poner la a temperatura ambiente (22°C). La muestra de semen se diluyó en medio de cultivo o PBS, a una concentración de 5-10 millones por mililitro. El tubo eppendorf de agarosa con bajo punto de fusión se introdujo en un flotador y se dejó al nivel de la tapa, se mantuvo durante 5 minutos en agua a 90-100°C, hasta que la agarosa se disolvió. Se transfirió el tubo con el flotador, a un baño termostato a 37°C, y se dejó 5 minutos hasta equilibrar la temperatura. Se añadieron 60 microlitros de la muestra de semen al contenido del tubo con agarosa y se resuspendió. Un portaobjetos preparado fue colocado en una superficie fría, a 4°C (por ejemplo, una lámina metálica o de vidrio). Una vez enfriado el portaobjetos, se depositó la suspensión celular del tubo de agarosa sobre la cara tratada del portaobjetos (superficie marcada con un punto rojo), se colocó un cubreobjetos de cristal,



evitando formar burbujas de aire. Se colocó una gota de 14, 20 ó 50 microlitros, para un cubreobjetos de 18x18mm, 22x22mm, ó 24x60mm, respectivamente. A lo largo de todo el proceso, el portaobjetos mantuvo en posición horizontal. Se Introdujo la lámina fría con el portaobjetos, en la nevera y se dejó gelificar la muestra durante 5 minutos.

Procesado de la muestra

Se preparó la solución desnaturalizante mientras se gelificaba la muestra. Para ello, se añadió 80 microlitros del contenido del tubo B en 10 mililitros de agua destilada, se mezcló y depositó en una caja de incubación. Se retiró el cubreobjetos, deslizándolo con suavidad y se introdujo inmediatamente el portaobjetos, en posición horizontal, en la solución desnaturalizante para dejar incubando durante 7 minutos, a temperatura ambiente (22 °C).

Se levantó el portaobjetos con ayuda de una lanceta, usando guantes. Se depositó también en horizontal, en una caja de incubación conteniendo 10 ml de solución de lisis, dejándolo incubar durante 25 minutos. Se levantó el portaobjetos y se introdujo en horizontal en una caja conteniendo abundante agua destilada para lavar la solución de lisis; con un tiempo de incubado de 5 minutos. Posteriormente se introdujo el portaobjetos, en horizontal, en una caja con etanol 70% (2 minutos), luego en etanol 90% (2 minutos) y finalmente en etanol 100% (2 minutos). Se dejó secar al aire. Una vez secos los portaobjetos se pueden guardar.

Tinción de la muestra.

Se mezcló solución de Wright con solución tampón fosfato (1:1), y se depositó una capa de colorante, en horizontal, que cubra el microgel seco. Se dejó tiñendo durante 5-10 minutos, Para posteriormente ser decantado, y lavar suavemente con agua corriente para que a continuación se dejara secar.

Análisis microscópico

Se contaron 500 espermatozoides en microscopio de campo claro con objetivo de inmersión y se sacó el porcentaje.

Espermatozoides sin ADN fragmentado

Se procedió a las lecturas de los espermatozoides con los diversos grados de fragmentación y se identificaron de la siguiente manera:

Espermatozoides normales

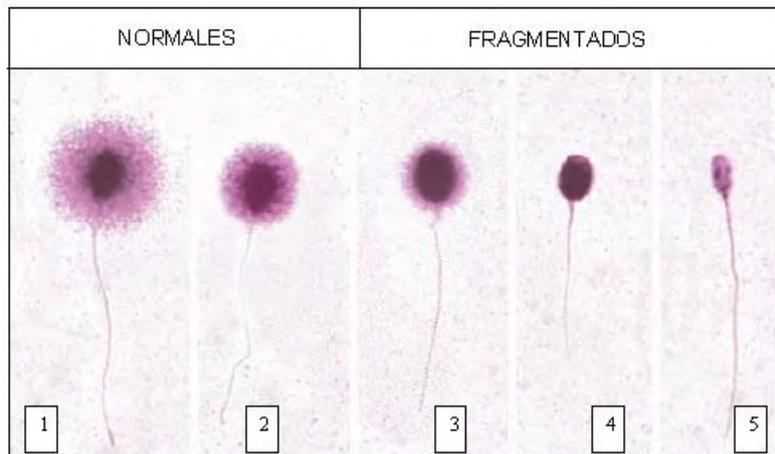
- **Espermatozoides con halo grande:** espermatozoides cuyo grosor del halo es igual o mayor a la longitud del diámetro menor del core ó diámetro de la cabeza (Figura 13 (1)).
- **Espermatozoides con halo mediano:** el grosor del halo está comprendido entre: mayor que 1/3 del diámetro menor del core y menor que el diámetro menor del core (Figura 13 (2)).

Espermatozoides con ADN fragmentado

- **Espermatozoides con halo pequeño:** el grosor del halo es igual o menor que 1/3 del diámetro menor del core, pudiendo ser de forma irregular o prácticamente inapreciable (Figura 13 (3)).
- **Espermatozoides sin halo** (Figura 13 (4)).

- **Espermatozoides sin halo y degradados:** aquellos que sin mostrar halo, presentan el core fragmentado en gránulos o muestran una tinción muy débil (Figura 13 (5)).
- **“Otros”:** núcleos de células que no corresponden a espermatozoides. Una de las características morfológicas que los distinguen es la ausencia de cola.

Figura 13. Espermatozoides en donde se muestra el grado de fragmentación de ADN espermático (Laboratorio de Indias, España).





ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS versión 16.0 en donde; a todos los grupos se les realizó una prueba "t" de student de muestras independientes para los datos de seminograma y fragmentación para la comparación entre grupos. Además de un diagrama de caja y bigotes para observar la dispersión de los grupos. En relación a fragmentación y morfología se utilizó el estadístico de Pearson para correlacionar estas características. Se consideraron como significativas aquellas diferencias que fueron igual o menor al 0.05.

RESULTADOS

Grupos de estudio.

Se contó con 44 muestras, las cuales fueron divididas en tres grupos: grupo I con 7 muestras de donantes con fertilidad comprobada a los cuales se les realizó seminograma y test de fragmentación, los cuales fueron tomadas como control, grupo II con 20 pacientes infértiles a los cuales se les realizó análisis de seminograma y test de fragmentación y finalmente un grupo de 17 pacientes infértiles a los cuales se les realizó el seminograma.

Tabla 1. Análisis seminal. Media \pm e.e.m. de los grupos analizados en donde se incluye grado de fragmentación de ADN espermático obtenido mediante el test SCD.

Características		Grupo I	Grupo II	Grupo III
Volumen ml		3.31 \pm 0.05	3.27 \pm 0.30	3.86 \pm 0.37
pH		7.56 \pm 0.06	7.56 \pm 0.03	7.59 \pm 0.04
Concentración mill/ml		114.03 \pm 13.52	110.88 \pm 13.03	64.06 \pm 12.48*
Vitalidad %		78.43 \pm 4.13	79.35 \pm 2.14	70.41 \pm 3.92
Debris celular		1.29 \pm 0.18	1.60 \pm 0.11	1.82 \pm 0.09 *
M O R F O L O G I A	Normales %	5.00 \pm 0.49	3.25 \pm 0.24*	2.29 \pm 0.29*
	Anormales %	95.00 \pm 0.49	96.75 \pm 0.24*	97.71 \pm 0.29*
	Alterac. Cabeza %	92.86 \pm 0.94	92.00 \pm 1.36	94.94 \pm 1.10
	Alterac. Pieza media %	88.14 \pm 2.344	91.90 \pm 0.95	91.29 \pm 1.64
	Alterac. Cola %	23.29 \pm 2.63	23.60 \pm 1.36	31.76 \pm 2.68
M O V I L I D A D	Tipo A	0.00 \pm 0.00	0.10 \pm 0.10	0.00 \pm 0.00
	Tipo B	56.00 \pm 2.19	51.40 \pm 2.17	43.88 \pm 3.38*
	Tipo C	15.00 \pm 1.13	16.75 \pm 1.36	16.12 \pm 1.43
	Tipo D	29.00 \pm 2.97	31.75 \pm 1.52	39.82 \pm 4.25
	Progresivos (A + B)	56.00 \pm 2.19	51.50 \pm 2.21	43.88 \pm 3.38*
	Total (A+B+C)	69.57 \pm 3.15	68.25 \pm 1.52	60.00 \pm 4.22
	Toal de móv. Prog. Mill	178.89 \pm 28.97	200.99 \pm 38.32	126.39 \pm 27.94
% Fragmentación de ADN en los espermatozoides		6.49 \pm 1.33	21.56 \pm 3.29*	-

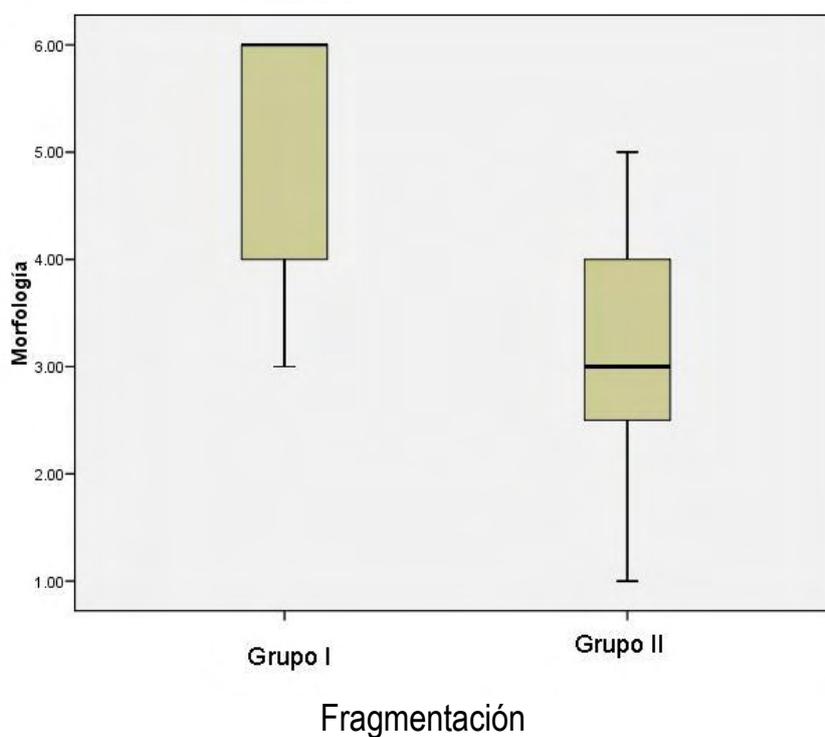
*p<0.05 respecto al grupo control (prueba de "t" de Student).



En el diagrama 1 se presenta los datos de morfología en relación a formas normales del grupo II en comparación al grupo I. Los resultados de fragmentación del grupo II, en comparación con el grupo I se muestran en el diagrama 2.

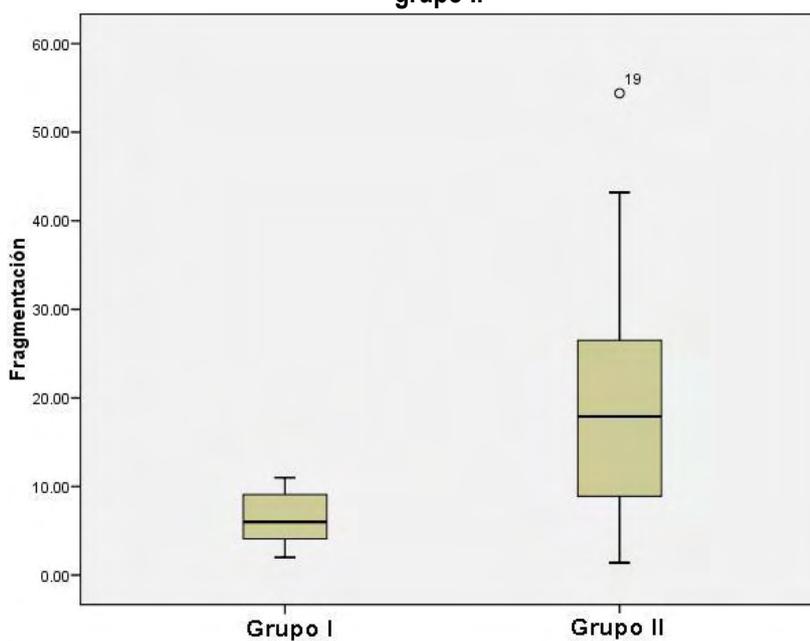
Morfología

Diagrama 1. Morfología de formas normales en donde se comparan grupo II en relación con grupo I.



Fragmentación

Diagrama 2. Índice de fragmentación de ADN espermático del grupo II en comparación con el grupo I.





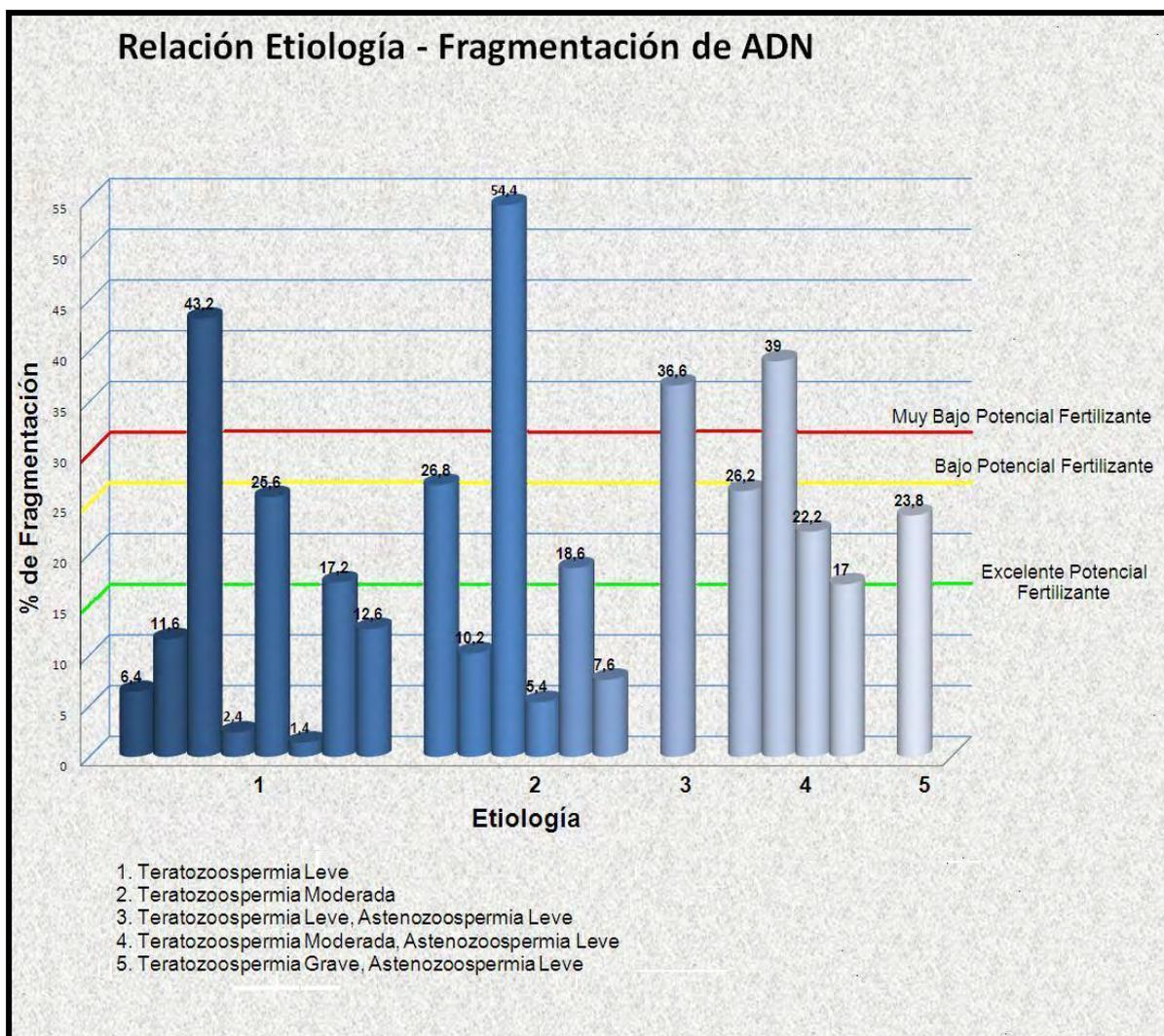
En la tabla 2 se muestra las etiologías que presentaron en cada uno de los grupos de estudio (I, II y III), en donde se muestra la n de datos y el porcentaje de etiologías por grupo.

Tabla 2. Etiologías obtenidas de seminograma de cada uno de los grupos de estudio.

Etiología	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Teratozoospermia Leve	6 (86%)	8 (40 %)	1 (5.88%)
Teratozoospermia Moderada	1(14%)	6 (30 %)	5(29.41%)
Astenoteratozoospermia Leve	–	1(5 %)	
Teratozoospermia Moderada, Astenozoospermia Leve	–	4(20 %)	4 (23.53%)
Astenoteratozoospermia Moderada	–	–	1 (5.88%)
Teratozoospermia Grave, Astenozoospermia Leve	-	1 (5%)	4 (23.53%)
Teratozoospermia Grave, Oligozoospermia Leve	–	–	1 (5.88%)
Astenoteratozoospermia Grave, Oligozoospermia Moderada	–	–	1 (5.88%)

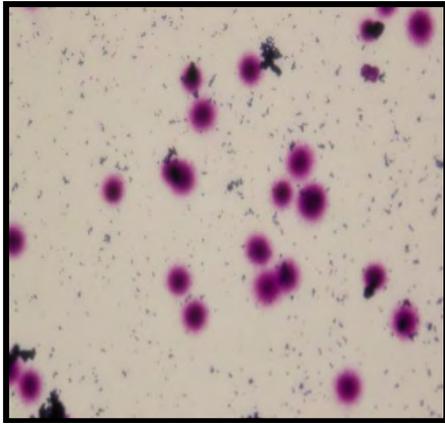
En la grafica 3 se observa los datos de grupo II en el cual se presenta etiología en relación al porcentaje de fragmentación de ADN espermático. De acuerdo a Everson y colaboradores en 1999, la correlación dependiendo del grado de fragmentación y potencial fertilizante es: Excelente si DFI < 15% (línea verde), alto si DFI 15-24% (línea amarilla), bajo si DFI 25-30% (línea roja), muy bajo si DFI > 30%. Se muestra que se presentan 8 etiologías con Teratozoospermia leve y un 40% de fragmentación.

Grafica 3. Grado de fragmentación y etiología de grupo II.

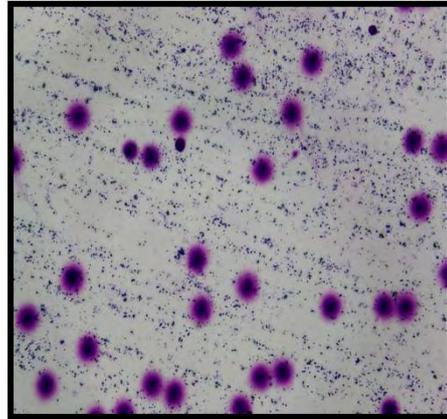


Las fotografías donde se muestra el grado de fragmentación en relación con la etiología se muestran en la figura 1. En ellas son visibles los distintos tipos de halos que se presentan cuando la muestra es normal se observa la presencia de halos grandes (Figura 13 (1,2)) y cuando se encuentra fragmentación se observa una ausencia de halo o halos pequeños (Figura13 (3, 4,5)).

Figura 1. Fotografías en donde se muestran algunos resultados de la prueba de fragmentación de ADN en los espermatozoides, además de la etiología.



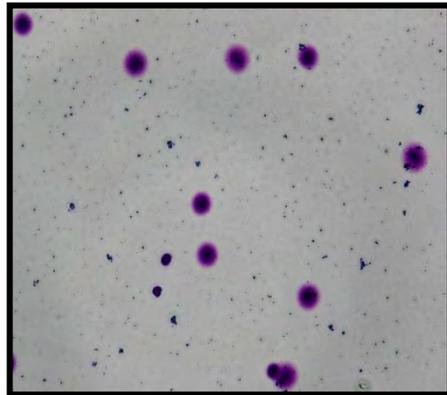
Teratozoospermia leve Grupo I



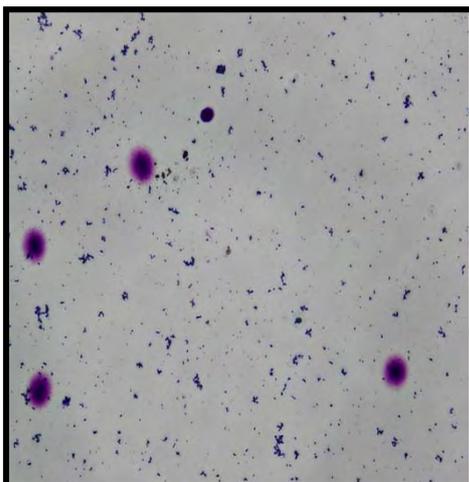
Teratozoospermia leve Grupo II



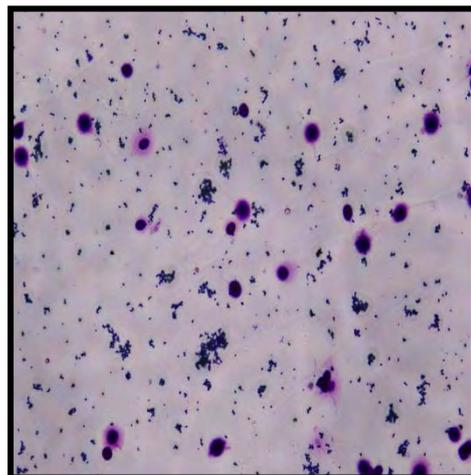
Teratozoospermia Moderada,
Astenozoospermia Leve Grupo II



Teratozoospermia Moderada Grupo II



Teratozoospermia Grave,
Astenoteratozoospermia Leve Grupo II



Astenozoospermia Leve Grupo II



DISCUSIÓN

La infertilidad es un problema común que afecta a una de cada seis parejas y se estima que, el 50% de estos casos son atribuibles a el factor masculino (Brugo et. al., 2003). Es por esta razón que la Organización Mundial de la Salud en 1999 estableció los parámetros básicos que se deben analizar en el estudio del factor masculino de forma rutinaria (volumen de eyaculado, concentración de espermatozoides, motilidad y morfología). Aún así, se estima que aproximadamente un 10 o 15% de los varones estériles presentan parámetros dentro de rangos normales (Morales et. al., 2007). Por todo lo anterior es necesario que a los pacientes que acuden por primera vez a una clínica para realizarse algún tratamiento de reproducción asistida (TRA), se le realice un estudio exhaustivo para determinar la posible cause de infertilidad de factor masculino para ayudar a determinar cual es la mejor TRA a realizar y con ello aumentar la probabilidad de éxito reproductivo.

La Criopreservación de espermatozoides se utiliza ampliamente para preservar la fertilidad masculina antes de la quimioterapia citotóxica, radioterapia, o ciertos tratamientos quirúrgicos que puede conducir a insuficiencia testicular o disfunción eyaculatoria (Gandini et. al., 2006). Además de profesionales que viajen frecuentemente, siendo en ocasiones difícil poder coordinar el momento en que se requiere su presencia física con el momento en que se deberá utilizar la muestra (Remohí et. al., 2008). La congelación del esperma antes de realizar un tratamiento, puede asegura la fertilidad del paciente y puede permitir a este ser padre de sus propios hijos mediante la utilización de Fecundación in Vitro (FIV) o inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) (Gandini et. al., 2006).

En el presente trabajo se utilizaron muestras criopreservadas de pacientes con problemas de infertilidad sin estudios previos.

Dentro del estudio se determinaron variables que presentan datos relevantes como son la morfología, la recuperación espermática y la fragmentación de ADN.

En relación al la morfología, en nuestro estudio de se encontró que el grupo II presentan mayor número de formas anormales en relación al grupo I con una **P= 0.002**. Además en el grupo III se presenta también una disminución de formas normales en relación al grupo I, con una **P= 0.000**, lo que probablemente nos podría ayudar a indicar el por que el grupo III no tuvo una buena descongelación.

La morfología es un factor muy importante ya que de acuerdo a Cuapio y colaboradores en 2008 encuentran un aumento en la morfología de espermatozoides normales que se correlaciona con el incremento en la tasa de gestación en procedimientos de inseminación homóloga y heteróloga.

La preparación de espermatozoides puede influir positivamente en la recuperación de los mejores espermatozoides para los procedimientos de reproducción. Además para prevenir el daño por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), se han desarrollado técnicas para recuperación de espermatozoides, tal es el caso de la utilización de gradientes de densidad o swim-up (Younglai et. al., 2001). Se sabe que la técnica de recuperación aumenta la población de móviles progresivos y morfológicamente normales para los procedimientos de TRA (Oehninger et. al., 1999).



Una preparación de espermatozoides por swin-up o por gradientes de densidad mejora notablemente la integridad del ADN (Zini et. al., 2000), así mismo el swin-up disminuye la población de espermatozoides con cromatina fragmentada (Piomboni et. al., 2006).

Por lo anterior se selecciono para el estudio la recuperación de espermatozoides por la técnica de swin-up, ya que en los procedimientos de TRA se requiere de los mejores espermatozoides y con el menor daño en el ADN.

Durante la última década, varias técnicas han surgido como posibles protocolos de evaluación de la cromatina y la integridad del ADN del espermatozoide. Recientemente el método más utilizado para medir fragmentación de ADN es el SCD o de dispersión de la cromatina espermática, el cual ha tenido buenos resultados ya que Chohan y colaboradores en el 2006 realizó un estudio en donde encuentra una correlación entre el test TUNEL y SCD en relación al SASC (análisis de la estructura de la cromatina espermática) con una $P=0.001$. Fernández y colaboradores en el 2005 realizan un estudio con el test SCD, de acuerdo a su investigación encontró que el test SCD es un método accesible, económico y puede utilizarse de manera rutinaria en un laboratorio de andrología. Con la ventaja a diferencia de las otras metodologías que este es específico para espermatozoides.

En lo que respecta a la fragmentación de ADN se ha determinado que el estado de la cromatina espermática y la integridad del ADN son factores críticos que pueden afectar el potencial fertilizante del varón (Tarozzi et. al., 2007). Por esta razón, es muy importante que además del seminograma se realice un test de fragmentación de ADN espermático para determinar cual es la posible causa de infertilidad masculina (Alvarez, 2005). Existen estudios en donde pacientes infértiles presentan mayor grado de fragmentación en el ADN espermático en comparación a grupos fértiles (Tarozzi et. al., 2007; Sergerie et. al., 2005). Este mismo comportamiento se observo en este trabajo, en donde; la fragmentación en el grupo II en relación al grupo I fue significativamente mayor con una $P=0.001$. Esta diferencia se observa de manera más clara en el diagrama 2 en donde además se encontró un caso en donde una muestra presenta un valor muy superior entre su mismo grupo, en relación al grado de fragmentación.

Esta situación se puede deber a que, existen múltiples factores que pueden estar involucrados en la posible causa de daño en el ADN espermático, como lo es: estrés oxidativo (Aiken y Krausz, 2001; Zini et. al., 2001), empaquetamiento anormal de la cromatina (Sakkas et. al., 1999; Manicardi et. al., 1995) apoptosis (Morales, 2007) entre otros factores que se presentan en pacientes con problemas de infertilidad.

Debido a que las muestras congeladas requieren de un crioprotector para evitar daño en el espermatozoide, se utilizo en el estudio medio de congelación TYB-G, ya que de acuerdo a la investigación realizada por Duru y colaboradores en el 2001 aparentemente no ocasiona daños en relación a la fragmentación de ADN utilizando el ensayo TUNEL. Además de que en su investigación Hammadeh y colaboradores en 2001a recomienda que el crioprotector para la preservación de semen más recomendable es el TYB-G ya que evita daño extra en la estructura de la cromatina y alteraciones de morfología. Este estudio se realizó tanto a donantes como pacientes, utilizando para la lectura de fragmentación de ADN espermático la técnica de naranja de acrilina y criterios estrictos de Krugger en relación a la morfología.



Cabe mencionar que este medio de criopreservación es no penetrante y solo actúa alrededor de la membrana plasmática de modo que induce la formación de cristales alrededor de la misma, protegiendo de esta manera a la célula (Remohí et al., 2008).

Se ha demostrado que la congelación es una excelente herramienta para preservar espermatozoides y realizar la fragmentación, se requiere de 5 a 10 millones de espermatozoides móviles progresivos posdescongelación para poder realizar el estudio, en el caso del trabajo se logro descongelar muestras que tuvieran esta concentración y movilidad. Los resultados muestran que se encontraron altos índices de fragmentación en del grupo II en comparación al grupo I (Tabla 1 y Diagrama 2) Esto sería indicativo que la congelación es una buena herramienta para preservar la fertilidad masculina (congelamiento de semen) y que se puede realizar la fragmentación en este tipo de muestras.

A pesar de las diversas técnicas en criopreservación, las muestras después de descongelar siguen presentando algunas deficiencias, a pesar de ello no parece un obstáculo para la fertilización o la tasa de embarazo en TRA, tal y como lo demuestran diversos autores (Hammadeh et al. 2001; Kuczynski et al. 2001). Se deben de tomar en cuenta estudios como el de Kramer y colaboradores en 1993, en donde se reporta un efecto perjudicial sobre la criopreservación de esperma humano debido a una marcada reducción en la motilidad. Recientemente también la integridad del ADN ha comenzado a ser ampliamente estudiada. Spano et al. 2000, utilizando el test SCSA reportaron un deterioro de la integridad nuclear del esperma después de la criopreservación al igual que Gandini et al., 2006 (SCSA), Donnelly et al. 2001 (cometa) y Duru et al. 2001 (TUNEL).

Las edades de nuestros controles fueron similares a la de los pacientes para poner de manifiesto esta relación en población latina (Vagnini *et al.*, 2007), en población latina (Brasil), que demuestra un incremento significativo en el grado de fragmentación con $P = 0.002$ utilizando test TUNEL, además de que Álvarez en el 2005 encontró una disminución de los paramentos seminales al igual que de la fragmentación de ADN con respecto a la edad. Ha diferencia del estudio realizado por Sun y colaboradores en el 1997 en donde no encuentra una correlación con edad y fragmentación de ADN utilizando el test TUNEL.

Lo que respecta a los parámetros seminales y el grado de fragmentación de ADN, se encontró que el grupo II presentan mayor grado de formas anormales en relación al grupo I como se observa en la tabla 1 y en el diagrama 1, Así mismo no se encontró una correlación entre morfología del espermatozoide en nuestro grupo (utilizando criterios estrictos de Kruger) y fragmentación de ADN, en donde las formas normales y anormales, presentan una $P = 0.152$. Este mismo comportamiento se observó en los estudios obtenidos por Irvin y colaboradores en el 2000, en donde no se encuentre una correlación entre el grado de fragmentación y la morfología en pacientes y donantes fértiles. Saleh y colaboradores en el 2002 mostraron que hombres con parámetros seminales normales, presentan altos niveles de fragmentación en el ADN. Ha diferencia de los resultados obtenidos Sills y colaboradores en el 2004 en donde observan una correlación del daño en el ADN y la morfología, entre otros parámetros, además de la concentración y movilidad.

Esto hace pensar que además de la fragmentación se deben de utilizar otras pruebas complementarias como lo es el FISH de espermatozoides para de determinar posibles alteraciones como son las anepluoidias.



A si mismo se debe de tomar encuentra que se tienen técnicas como el ICSI en el tratamiento de hombres infértiles y que permite trabajar con muestras de muy mala calidad seminal, y por tanto, una de las principales preocupaciones es el posible uso involuntario de espermatozoides con daño en el ADN para fertilizar ovocitos. Los reportes han sugerido posibles consecuencias adversas como, fracaso en la fertilización, muerte temprana de embriones, abortos espontáneos, cáncer infantil e infertilidad en la descendencia (Aitken et. al., 2007). Celik-Ozanci et. al., 2004 encontraron que los espermatozoides con formas normales podrían presentar aberraciones y llego a la conclusión que la forma del espermatozoide no es fiable en la selección de espermatozoides para ICSI, además Brugum y colaboradores en el 2007 proponen en las conclusiones de su trabajo que todos los hombres con problemas de fertilidad deberían ser probados con SCSA además del análisis del semen. Cuando el DFI supere el 30%, el ICSI debería ser el método de elección.

Un punto muy importante en el análisis seminal es la etiología (padecimiento), ya que en base a ella se lleva a cabo la selección del TRA. Una posible correlación entre fragmentación y etiología no se encontró en el presente estudio, en donde se contó con diferentes etiologías (Tabla 2), independientemente de la n muestral que se tuvo (tabla 1). A pesar de ello, se tienen estudios en los cuales se obtienen buenos resultados con una n pequeño, como es el caso de Avendaño y colaboradores en el 2008 en donde con una muestra de 19 individuos se logro evaluar el daño en el ADN en espermatozoides con morfología aparentemente normal, obteniendo resultados importantes.

En la grafica 3 se observa el grupo de pacientes con Teratozoosermia leve, en donde 5 muestras de 8 en total, presentan un grado de fragmentación (DFI) menor o igual el 15% como fueron 6.4, 11.6, 2.4 12.6 y 2.4 %, que de acuerdo a lo propuesto por Everson y colaboradores en 1999 sugiere que la muestra presenta un excelente potencial fertilizante.

También se tiene un paciente con 17.2 % de DFI y se considera como alto potencial fertilizante. Además de una muestra con DFI de 25.6 % que se considera como bajo potencial fertilizante y finalmente en este grupo una muestra que presenta 43.2 % de DFI que se considera con un muy bajo potencial fertilizante y de acuerdo a Everson y colaboradores en 2005 sugiere que pacientes que presentan más del 30 % de fragmentación en espermatozoides no pueden embarazar de forma natural a sus parejas.

Con lo que respecta al grupo de Teratozoospermia moderada se encontraron 3 muestras las cuales presentan un excelente potencial fertilizante (10.2, 5.4 y 7.6 de DFI). Así mismo se presenta una muestra considerada como alto potencial debido ha que presenta un 18.2 % de DFI, otra con bajo potencial con un DFI de 26.8 % y finalmente una muestra con DFI de 54.6 considerada con un muy bajo potencial fertilizante.

En relación al grupo de Teratozoospermia Leve, Teratozoospermia Leve se encontró un DFI del 36.6 % indicando un potencial fertilizante bajo, el grupo de Teratozoospermia Moderada Astenozoospermia Leves se encontraron 2 muestras con un alto potencial fertilizante debido a que presentaban un DFI de 22.2% y 17% respectivamente y dos muestras consideradas con bajo potencial fertilizante ya que presentaron un % de DFI de 39% y 26.2% respectivamente. Finalmente el último grupo con Teratozoospermia Grave, Astenozoospermia Leve se obtuvo un alto potencial fertilizante con un 23.8 de DFI.



Esto conlleva a que las etiologías juegan un papel muy importante en la evaluación de pacientes infértiles, ya que los pacientes que presentan Teratozoospermia leve en nuestro trabajo, son el grupo que presenta más muestras con menor grado de fragmentación y se presenta una tendencia en general de aumento del DFI en relación a la severidad de las etiologías, (Gráfica 3).

Al congelar las muestras se encontró que algunas de ellas al descongelar no se lograba recuperar la cantidad necesaria de espermatozoides para el análisis y se observó que presentaban etiologías con clasificación de moderadas y/o graves, o bien presentan dos o más etiologías (tabla 2) (ha excepción de una muestra que presentó Teratozoospermia leve) por ello para estudios posteriores es recomendable realizar un test SCD en fresco para este tipo de etiologías, ya que cuando la muestra es congelada, no se obtiene la concentración de 5 a 10 mill/ML de móviles progresivos para determinar DFI. La posible causa puede ser que el grupo III ya presentan una baja concentración en relación al grupo I como se muestra en la tabla 1 en donde se presenta una $P = ,015$ además de una movilidad también inferior con $P = ,007$ en relación a movilidad tipo B, lo que podría indicar el por que no se cumple con las características requeridas para el análisis de fragmentación de ADN de los espermatozoides utilizando el test SCD.

Finalmente se encontró una diferencia significativa con una $P = ,028$ en relación al debris celular del grupo III en relación al grupo I como se observa en la tabla 1, esta situación puede presentarse debido a que los pacientes podrían haber presentado una infección al momento de colectar la muestra.

En pacientes que presentan altos índices de DFI se sugiere en base a estudios como el de Greco y colaboradores en el 2005a que el tratamiento de antioxidantes orales reduce el porcentaje de espermatozoides dañados y mejorar los resultados de ICSI en pacientes con lesiones del ADN de esperma (Greco et. al., 2005b).



CONCLUSIONES

En la realización de un análisis SCD para determinar fragmentación de ADN en pacientes que optan por TRA es en la actualidad una herramienta muy útil para poder determinar la posible causa de infertilidad masculina y además de ello para elegir la mejor TRA y con ello aumentar las posibilidades de gestación.

En este estudio en población mexicana se encontró mayor grado de fragmentación de ADN en pacientes infértiles en relación a grupo de fértiles, en el estudio no se encontró una correlación entre la fragmentación y las etiologías al igual que la morfología espermática. Existen investigaciones que muestran este mismo comportamiento en poblaciones diferentes a la mexicana.

Es importante realizar un estudio de fragmentación de ADN en espermatozoides antes de cualquier TRA en pacientes infértiles, ya que proporciona al médico la información para que seleccione la mejor técnica de reproducción asistida, en donde probablemente la mejor opción de acuerdo a estudios en pacientes que presentan altos índices de fragmentación es el ICSI.



ABREVIATURAS.

TRA	Técnicas de Reproducción Asistida
ICSI	Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide
FIV	Fecundación in Vitro
IA	Inyección intra citoplasmática
T	Testosterona
LH	Hormona Luteinizante
FSH	Hormona Foliculoestimulante
GH	Hormona del Crecimiento
GnRH	Hormona gonadotrópica
WHO	Organización Mundial de la Salud
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
SCSA	Análisis de la Estructura de la Cromatina Espermática
ROS	Especies Reactivas al Oxígeno
AO	Naranja de Acridina



BIBLIOGRAFÍAS

- Agarwal A, Allamaneni S. (2005). Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Rev Int Androl.* **3**: 31-37.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* **79**: 829–843.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. (2007). Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online.* **14**: 727–33.
- Aitken RJ, Krausz C. (2001) .Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* **122**: 497-506.
- Aldave VJ. (1994). Criptorquidia y varicocele, puesta al día. IV Curso de actualización andrológica. Ed Ipar.sl, Pamplona.
- Álvarez GJ. (2007). Estudio de la integridad del ADN espermático. *Centro de infertilidad masculina. Androgen.* **11**: 27-39.
- Andolz P, Bielsa MA, Vila J. (1999). Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod.* **14**: 731-735.
- Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. (1997). Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res.* **236**: 231-237.
- Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. (2008).
- Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. (2000). Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod.* **15**:13 38-44.
- Bassas L, Mata A, Navas M, García A, López O. (2000) Criopreservación preventiva de semen en hombres sometidos a tratamientos inductores de esterilidad: seguimiento clínico y reproductivo. *Urol Integr Invest,* **5**: 20-26.
- Benchai M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF. (2003) Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* **18**: 1023.
- Benchai M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, François Guerin J. (2007). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril.* **87**: 93-100.
- Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ.(1996). Gonadal cell apoptosis hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update.* **2**: 103-117
- Brandiff B y Pedersen RA. (1981) Repair of the ultraviolet-irradiated male genome in the fertilized mous eggs. *Science.* **211**: 141-1433.



Brinkworth MH, Nieschlag E. (2000). Association of cyclophosphamide-induced male-mediated, foetal abnormalities with reduced paternal germ-cell apoptosis. *Mutat Res.* **447**: 149-54.

Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. (2003). Definición y causas de la infertilidad. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología.* **54**: 227-248.

Brugum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M Brugum L, Erempreiss J. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome, *Human Redrod.* **22**: 174-179.

Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. (2004). The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* **19**: 1401-1408.

Carrell DT, Liu L (2001). Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermatogenesis. *J Androl.* **22**: 604-610.

Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. (2003). Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl.* **49**: 49-55.

Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray- Ward P. (2004). Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod.* **19**: 2052-2059.

Cho C, Jung-Ha H, Willis WD. (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod.* **69**: 211-217.

Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* **27**: 53-59.

Cocuzza M, Sikka S, Athayde K, Agarwal A. (2007). Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male Infertility: An Evidence Based Analysis. *Journal Urol.* **33**: 603-621.

Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas.* **31**:120-131

Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW and Ball GD (1988) Cryopreservation of human spermatozoa. **3**. The effect of cryopreservation on motility. *Fertil Steril.* **50**,314-320.

Crosignani PG, Collins J, Cooke ID, Diczfalusy E, Rubin B. (1993) Unexplained infertility. *Hum Reprod.* **8**: 977.

Cuapio P, Quezada L, Guerrero D, García G, Dabbah J y Rocha F. (2008). Importancia de los Espermatozoides Móviles Progresivos en Inseminación Homóloga y Heteróloga. XLV. Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Medicina de la Reproducción.



- Dinulovic D, Radonjic G. (1990). Diabetes mellitus and male infertility. *Arch Androl.* **25**: 277-284.
- Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, Van den Ouweland AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC. (2002). Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod.* **17**: 13-16.
- Donnelly T, Steele E, McClure N, Lewis S. (2001). Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction.* **16**: 1191-1199.
- Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. (2002). Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* **17**: 3122.
- Duru N.K., Morshedi M.S., Schuffner A. and Oehninger S. (2001). Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalisation and not DNA fragmentation. *J. Androl.* **22**: 646–651.
- Edwards R G. (1995). Brody SA. Principles and practice of assisted human reproduction. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 109-149.
- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. (2006) .Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl.***8**: 11-29.
- Evenson D, Wixon R. (2006). Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online.* **12**: 466-472.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* **14**: 1039–1049.
- Evenson DP, Larson KJ, Jost LK. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.***23**: 25–43.
- Evenson DP, Wixon R (2005): Comparison of the Halosperm1 test kit with the sperm chromatin structure assay (SCSA1) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil Steril.* **84**: 846–849.
- Everson D, Darzynkiewicz Z, Melamed M. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* **210**: 1131- 1133.
- Fernández J, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez E, Enciso M LaFromboise M, De Jonge C. (2005). Halosperm® is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril.* **84**: 833– 842.
- Fernández JL, Goyanes VJ, Ramiro_Díaz J, Gosalves J. (1998). Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet.* **82** : 251-256.



Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Álvarez JG. (2003). The Sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* **24**: 59-66.

Fernandez JL, Vazquez-Gundin F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz J, de la Torre J. (2000). DNA breakage detection- FISH (DBD-FISH) in Human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res.* **453**: 77-82.

Fuentes-Mascorro, G, Serrano H. (2000). Rosado, A.: "Sperm chromatin". *Arch. Androl.*, **45**: 215,220.

Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spano M, Dondero F. (2006). Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell and Tissue Banking.* **7**: 9–98.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* **15**: 830-839.

Garrido N, Meseguer M, Martínez-Conejero JM, Simon C, Pellincer A, Remohí J. (2005). Impacto de los criterios estrictos de morfología espermática en reproducción asistida. **11**: 9-14.

Garrido N, Meseguer M, Simón C, Pellicer A, Remohí J. (2002). Factor masculino y técnicas de reproducción asistida. *Revista de ASEBIR.* **7**: 10-24.

Garthner P, Haití. (2002). *Histología, texto y atlas.* Mc Graw – Hill. 426-444.

Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J. (1992). Repair of human sperm Chromosome aberration in the hamster egg. *Hum Genet.* **82**: 181-186.

Gorczyak W, Gong J, Darzynkiewicz Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* **53**: 945-951.

Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. (2005). Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl.* **26**: 349-353. (a).

Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. (2005). Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* **20**: 226-230. (b).

Gutiérrez GR. (2007) Daño al ADN espermático: aspectos clínicos y biológicos *Rev Cubana Endocrinol.* **18**: (en línea).

Guyton Arthur C. (2001). *Tratado de fisiología medica, sexta edición,* editorial Mc Graw Hill, México.

Guzick D, Sullivan M, Adamson G, Cedars M, Falk R, Peterson E, Steinkampf. MP. (1998). Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril.* **70**:207-213.



Hammadeh M. E. Greiner S. Rosenbaum P. Schmidt W. (2001). Comparison Between Human Sperm Preservation Medium and TEST-Yolk Buffer on Protecting Chromatin and Morphology Integrity of Human Spermatozoa in Fertile and Subfertile Men After Freeze-Thawing Procedure. *Journal of Andrology*. **22**: 1012–1018a.

Hammadeh M.E., Kuhn A., Amer A.S., Rosenbaum P. and Schmidt W. (2001). Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. *Int. J. Androl*. **24**: 360–368b.

Hellstrom WJG. (1997). *Male infertility and Sexual dysfunction*. Ed Springer. 175-182.

Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF. (2004). Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*. **81**: 965-972.

Hershlag A, Schiff SF, DeCherney AH. (1991). Retrograde ejaculation. *Hum Rep*. **6**: 255-258.

Homonnai ZT, Fainman N, David MP, Paz GF. (1982). Semen quality and sex hormone pattern of 29 middle aged men. *Andrologia*. **14**: 164-170.

Høst A, Halken S. (2002). Can we apply clinical studies to real life? Evidence-based recommendations from studies on development of allergic diseases and allergy prevention. *Allergy*. **57**: 389-397.

Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. (2005). Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril*. **84**: 130-140.

Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. (1996). A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod*. **2**: 613-619.

Irvine DS, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P and Aitken RJ. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *Journal of Andrology* **21**: 33-44.

Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. (2004). DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction*. **4**: 932-939.

Jarow JP (2003). Endocrine causes of male infertility. *Urol Clin North Am*. **30**: 83-90.

Jarow JP, Coburn M, Signan M. (1996). Incidence of varicoceles in men with primary and secondary infertility. *Urology*. **47**: 73-6.

Jedrzejczak P, Szumala-Kalol A, Dydowics P. (1996). Usefulness of counting leukocytes and round cells in determination of bacterial infection of semen in infertile men. *Gynekol Pol*. **11**: 569-573.

Junqueira C. Carreiro J. (2005). *Histología básica*. 6 edición. Masson. España. 415-431.



Kamischke A, Nieshlag E. (1999). Treatment of retrograde ejaculation and anejaculation. *Hum Rep update*. **5**: 448-474.

Kelleher S, Wishart SM, Liu PY, Turner L, Di ierro I, Conway AJ, Handelsman DJ. (2001) Long-term outcomes of elective human sperm cryostorage. *Hum Reprod*, **16**: 2632-2639.

Klonoff-Cohen H, Lam-Kruglick P, González C. (2003). Effects of maternal and paternal alcohol consumption on the success rates of in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril*. **79**: 330-339.

Kramer R, Gamer D, Bruns E. (1993). Comparison of motility and flow cytometric assessments of seminal quality in fresh, 24-hour extended and cryopreserved human spermatozoa. *J. Androl*. **14**: 374-384.

Krüger TF, Acosta AA, Simmons KF. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril*. **49**: 112-117.

Kuczynski W., Dhont M., Grygoruk C., Grochowski D., Wolczynski S. and Szamatowicz M. (2001). The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa – a prospective randomised study. *Hum. Reprod*. **16**: 2109-2113.

Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. (2003). Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril*. **79**: 287-291.

Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod*. **15**: 1717-1722.

Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. (2003). Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. **80**: 895-902.

Lass A, Akagbosu F, Brinsden P. (2001) Sperm banking and assisted reproduction treatment for couples following cancer treatment of the male partner. *Hum Reprod Update*. **7**: 370-377.

Liu D, Baker H. (1992). Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril*. **58**: 1178-84.

Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. (1998) Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. **13**: 896-900.

Mahadevan MM, Trounson AD, Leeton JF. (1983) Successful use of human semen cryobanking for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, **40**: 340-343.

Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U. (1995). Presence of endogenous nick in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*. **52**: 864-867.

Matsuda Y, Tobarí I. (1988). Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light and methyl and ethyl methanesulfonate. *Mutation Res*. **198**: 131- 144.



Mazundar S, Levine AS. (1998). Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Fertil Steril.* **70**: 799-810.

McPerson SMG, Long FJ. (1993). Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Devel Biol.* **158**: 122-130.

Morales R, Lledó B, Ortiz José A, Rodríguez-Arnedo Dori, Fabregat A, Bernabeu R. (2007). Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Fertilidad.* **24**: 305-313.

Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* **17**: 990-998.

Mortimer D, Menkveld R. (2001). Sperm morphology assesment historical perspectives and current opinions. *Journal Androl.* **20**: 192-205.

Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JB. (2006). Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril.* **85**: 496-499.

Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr. (2004) Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod.* **19**:129-138.

Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. (2003). Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl.* **24**: 253-262.

Murphy JB, Lipshultz L. (1987). Abnormalities of ejaculation. *Urol Clin North Am.* **14**: 583-596.

Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. (2001). Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* **18**: 219-225.

Oehninger S, Acosta R, Morshedi M, Philput C, Swanson RJ, Acosta AA. (1999). Relationship between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up sperm fractions. *Journal Androl.* **11**:446-452.

Oliva A, Spira A, Multigner L. (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod.* **16**: 1768-1776.

Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* **19**: 426-436.

Ollero M, Gil-Guzmán E, Sharma RK, López MC, Larson KL, Evenson DP, Agarwal A, Thomas AJ, Alvarez JG. (2001). Characteriza tion of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod.* **16**: 1912-1921.

Padrón D. Fernandez L, Gallardo R. (1998). Interpretación de un análisis de semen. *Rev Cubana de Endocrinología.* **9**: 81-90.



Padrón OF, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. (1997) Effects of cancer on spermatozoa quality after cryopreservation: a 12-year experience. *Fertility and Sterility*. **67**:326-331.

Padrón RS. (1990). Temas de reproducción masculina y diferenciación sexual. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 48-63, 64-76, 164-80.

Pagés G, Aller J. (2006). Infertilidad. Fisiología, diagnóstico y tratamiento. Amolca. México. 24-29.

Palacios A. Azoospermia en cáncer de testículo: obtención de embarazo por ICSI. XV reunión de ALIHR, 1997 Abr 27-30. Cusco, Perú.

Parinaud J, Mieusset R, Veitez G, Labal B, Richiilley G. (1993). Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril*. **60**: 888-892.

Passarge Eberhard MD. (2001). Genética. 2ª Edición. Panamericana. México. 38-42

Pérez M, Padrón RS, ArceB, Peralta H. (1984). Características químicas del semen en un grupo de hombres aparentemente sanos. *Rev Cuvana Med*. **23**: 554-558.

Pierce B. (2004). Genética. Un enfoque conceptual. 2da edición. Panamericana. 265-283.

Piomboni P, Bruni E, Capitani S, Gambera L, Moretti E, La Marca A, De Leo V, Baccetti B. (2006). Ultrastructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm. *Arch Androl*. **5**: 51-59.

Pomerol JM, Arrondo JL. (1994). Práctica Andrológica. Barcelona: Ed Mason-Salvat.

Remohí J, Romero J. L, Pellicer A, Simón C, Navarro J. (2008). Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. Mc Graw Hill Interamericana, 265-351.

Rodríguez M, Navarro J, Grimalt L, Remohi J, Gil Salom M. (2000). Diagnóstico y conducta a seguir en el varón. En: Remohi J, Romero JL, Pellicer A, Simón C, Navarro J, editores. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 51-64.

Sadler TW. (2004). Embriología Médica. 9ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 23 - 29.

Sailer BI, Jost LK. Everson DP. (1995). Mamalian sperm DNA susceptibility to in situ determination associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *Journal Androl*. **15**: 80-87.

Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D. (2003). Sperm nuclear damage in the human. In: Robaire B, Hales BF, eds. *Advances in male mediated developmental toxicity*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 73-84.

Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG. (2000). The use of the two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod*. **15**: 1112-1116.



Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* **4**: 31-37.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* **66**: 1061-1067 (a).

Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA. (2002). Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril.* **78**: 1215-24.

Saleh RA, Agarwal A, Nada ES, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. (2003). Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 79 Suppl. **3**:1597-1605.

Sánchez M, César M, Farré R, Magaña P, Aulesa C. (2005). Varicocele: fisiopatología y actualización diagnóstica desde el laboratorio. *Fertilidad.* **22**: 261-267

Sanger WG, Oslon JH, Sherman JK (1992) Semen cryobanking for men with cancer—criteria change. *Fertil Steril.* **58**: 1024-1027.

Schoor RA, Elhanbly SM, Niederberger C. (2001). The pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *Curr Urol Rep.* **2**: 432-436.

Schulze W, Thoms F, Knuth UA. (1999). Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Hum Reprod.* **1**:82-96.

Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. (2004). Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* **82**: 378- 383.

Sergerie M, Laforest1 G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. (2005). Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reproduction.* **20**: 3446-3451

Sergerie M, Martinet S, Kiffer N, Teulé R, Pasquier C, Bujan L. (2004). Impact of reverse transcriptase inhibitors on sperm mitochondrial and genomic DNA in assisted reproduction techniques. *Gynecol Obstet Fertil.* **32**: 841-849.

Shamsi MB, Kumar R, Dada R. (2008) Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction Indian. *J Med.* **127**: 115-123.

Sills ES, Fryman JT, Perloe M, Michels KB, Tucker MJ.(2006). Chromatin fluorescence characteristics and standard semen analysis parameters: correlations observed in andrology testing among 136 males referred for infertility evaluation. *J Obstet Gynaecol.* **24**:74.

Singh NP, Muller CH, Berger RE. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril.* **80**: 1420-30.

Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A. (2006). Increased sperm



DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod.* **21**:986-93.

Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril.* **73**:43-50.

Sun J, Jurisikova A, Casper RF. (1997). Detection of Deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* **56**: 602–607.

Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. (2007). Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* **14**: 746–757.

Teppa G, Palacios T. (2004). Evaluación actual de la infertilidad masculina. *Invest clín.* **45**: 355-370.

Tesarik J, Greco E, Mendoza C. (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod.* **19**: 611-5

Tesarik J, Mendoza C, Greco E. (2002). Paternal effects actino during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod.* **17**: 184-189.

Thomas H, Dzielak D, Hall J, Lohmeier T. (2007). Compendio de fisiología médica. Decimo primeara edición. ELSEVIER, España. 626-630.

Tiepolo L, Zuffardi O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in non-fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.* **34**: 119-124.

Tresguerres JAF, Agular Banites de Lugo E, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil-Loisaga P, Lahera Julia V, Martínez Verano J, Moar Teruel F, Rodríguez Roisín R, Romano Pardo M, Tamargo Menéndez J, Zarco Gutiérrez P. (1999). *Fisiología Humana. 2a Edición. Interamericana. España.* 1034-1047.

Trisini AT, Singh NP, Duty SM, Hauser R. (2004). Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. *Fertil Steril.* **82**: 1623-32.

Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod.* **13**: 1864-1871 (a).

Twigg, JP, Irvinr, DS and Aitken, RJ. (1998). Oxidative damage to AND in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod.* **13**: 896-900 (b).



Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG Jr. (2007). The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed*. **15**: 514-519.

Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. (2004). Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. **81**: 1289-95.

Wang H, Hiatt WR, Barstow TJ, Brass EP. (1999). Relationships between muscle mitochondrial DNA content, mitochondrial enzyme activity and oxidative capacity in man: alterations with disease. *Eur J*. **80**:22-27

World Health Organization (1999). WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen_cervical mucus interaction. Cambridge University press.

Wykes M, Krawetz A. (2003) The Structural Organization of Sperm Chromatin. *The journal of biological chemistry*. **278**: 29471–29477.

Yavetz H, Yogev L, Hauser R, Lessing J, Paz G, Homonnai Z. (1994). Retrograde ejaculation. *Hum Rep*. **9**: 381-86.

Yen Samuel SC, Jaffe Robert B, Barbieri Robert L. (1999). *Endocrinología de la reproducción*. 4a Edición. Panamericana. Uruguay. 664-670.

Yoshida H, Hoshiai H, Fukaya T, Ohi T, Kakuta C, Tozawa H, Mandai Y, Murakami T, Mansfield C and Yajima A (1990) Fertilizability of fresh and frozen human spermatozoa. *Assist Reprod Technol Androl* **1**,164–172.

Younglai E, Hotl D, Brown P, Jurisicovas A, Casper R. (2001). Sperm swim-up technique and DNA fragmentation. *Hum Reprod*. **16**: 1950-1953.

Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. (2000). Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology*. **56**: 1081-1084.