

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CLINICA DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA AGN Y ASOCIADOS  
HOSPITAL ÁNGELES DEL PEDREGAL

ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN PACIENTES  
CON INFERTILIDAD MASCULINA SOMETIDOS A CICLOS DE ALTA  
COMPLEJIDAD

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN  
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA PRESENTA:

DRA. CIZANI MENESES NÚÑEZ

PROFESOR TITULAR DEL CURSO:  
DR. ALFONSO GUTIÉRREZ NÁJAR

ASESOR DE TESIS:  
DRA. MARÍA DEL SOCORRO BENAVIDES SALAZAR  
DRA. MABEL CERRILO HINOJOZA

MEXICO D. F. AGOSTO 2009.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

DR. ALFONSO GUTIÉRREZ NÁJAR  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN  
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA  
DIRECTOR GENERAL DE LA CLÍNICA EN REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA  
HOSPITAL ÁNGELES DEL PEDREGAL

DRA. MABEL CERRILLO HINOJOZA  
ASESOR DE TESIS EN ÁREA GENÉTICA  
GENETISTA TITULAR DEL ÁREA DE GENÉTICA DE LA  
CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA  
HOSPITAL ÁNGELES DEL PEDREGAL

DRA. MARÍA DEL SOCORRO BENAVIDES SALAZAR  
ASESOR DE TESIS EN EL ÁREA CLÍNICA Y  
PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN  
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA  
CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA  
HOSPITAL ÁNGELES DEL PEDREGAL

## DEDICATORIA

A Dios, siempre presente en mi vida, por guiar e iluminar mi camino, mi mente y mi corazón.

A mis padres, José Félix y María Teresa, fuente de mi mayor admiración e inspiración en cada día de mi vida.

A mis hermanos Tonatiuh, Xochitl y Zazil por impulsarme con su amor y ejemplo a ser mejor persona cada día.

A Humberto, mi esposo y compañero de vida, por su amor y apoyo presente y futuro, por darme fortaleza y esperanza día con día.

A mis pequeños genios, Erik, Fernanda y Derek, quienes con su ternura, amor y espontaneidad llenan mi corazón.

A toda mi familia que con sus pequeños y grandes detalles me han regalado momentos inolvidables

A todos mis maestros que con paciencia y altruismo contribuyeron a ser de mí una mejor persona y médico.

Agradezco de manera especial al personal del **Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México** por las facilidades brindadas para la realización del estudio de la fragmentación del ADN espermático mediante la técnica COMETA.

ÍNDICE	Página
I. RESUMEN	5
II. SUMMARY	6
III. INTRODUCCIÓN	7
IV. MARCO TEÓRICO	
4.1 Antecedentes	8
4.2 Espermatogénesis	9
4.3 Causas de la infertilidad masculina	
4.4 Factores de riesgo asociados a la fragmentación del ADN espermático	11
4.5 Fragmentación del ADN espermático como proceso fisiológico	12
4.6 Fragmentación del ADN espermático como proceso patológico	13
4.7 Papel de las caspasas en la fragmentación del ADN espermático	14
4.8 Papel del varicocele en la fragmentación del ADN espermático	15
4.9 Técnicas para el análisis de la fragmentación del ADN espermático	16
4.10 Ensayo COMETA para el análisis de la fragmentación del ADN espermático	17
4.11 Influencia de la fragmentación del ADN sobre la calidad espermática	19
4.12 Fragmentación del ADN espermático el desarrollo embrionario	20
4.13 Papel de los antioxidantes en la prevención de la fragmentación del ADN espermático	21
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
VI. OBJETIVO	23
VII. HIPÓTESIS	23
VIII. JUSTIFICACIÓN	23
IX. MATERIAL Y MÉTODOS	24
X. RESULTADOS	25
X. DISCUSIÓN	32
XII CONCLUSIONES	34
XIII. BIBLIOGRAFÍA	35

## I. RESUMEN

**Introducción.** La infertilidad representa un problema clínico importante, los datos recientes sugieren que al menos una de cada cuatro parejas que buscan embarazo, experimenta diversas dificultades para lograrlo. En múltiples estudios se reporta como factor causal prevalente, defectos en la calidad del semen. <sup>(1)</sup> A pesar de los datos que brinda la espermatobioscopía directa, se estima que aproximadamente un 10 a 15% de los varones infértiles presentan parámetros convencionales normales. En las últimas décadas, los laboratorios han incluido ensayos con biomarcadores moleculares de infertilidad, tales como el análisis la fragmentación del ácido desoxirribonucleúco (ADN) espermático o el análisis de la cromatina espermática <sup>(2)</sup> Alrededor del 10% de los espermatozoides de hombres fértiles y aproximadamente del 20-25% de los espermatozoides de hombres infértiles, poseen niveles detectables de daño al ADN <sup>(3)</sup>. La integridad del ADN espermático es esencial para la adecuada transmisión del código genético, y está considerado como un indicador de la integridad de la espermatogénesis y el potencial de la fertilidad masculina <sup>(3,4)</sup>.

**Material y métodos.** Esta es la primera parte de un estudio prospectivo donde se incluyeron 30 pacientes, que acudieron durante el año 2007 y 2008 a la clínica por presentar infertilidad masculina y a quienes se les analizó el factor de fragmentación del ADN espermático como causa de infertilidad. Se utilizó el ensayo COMETA para el análisis de la fragmentación del ADN espermático. Se formaron 2 grupos, el primero formado por los pacientes cuyas muestras fueron sometidas a capacitación espermática y, como segundo grupo, los pacientes cuyas muestras se analizaron sin capacitación. Se revisó el porcentaje de fragmentación y la influencia de los diversos factores ambientales de riesgo en ambos grupos (tabaquismo, alcoholismo, obesidad, sedentarismo, hipertermia, tóxicos, varicocele).

**Resultados.** La edad promedio de los pacientes fue de 42.5 años, 4 de 30 pacientes (13.6%) tuvieron antecedentes de exposición de riesgo a diversos tóxicos, 5 de 30 pacientes (16.6%) tuvieron tratamiento antioxidante, 6 de 30 pacientes (20%) presentaron varicocele en diversos grados. El 100% de las muestras registraron parámetros anormales en la espermatobioscopía directa, 22 pacientes (73.4%) con oligoastenoteratozoospermia y en 8 pacientes (26.6%) se observó astenoteratozoospermia. 17 de las 30 muestras (56.6%) fueron capacitadas. El 96.67% de las muestras presentaron un índice de fragmentación del ADN mayor del 5% (medido por la intensidad de la fluorescencia de la cola (Olive Tail Moment, OTM). La media de fragmentación del ADN fue de 14.7%. El porcentaje promedio de fragmentación fue mayor en el grupo de muestras no capacitadas, con mayor porcentaje en aquellos expuestos a sólo algunos de los factores de riesgo, como antecedente de alcoholismo (15.8%), expuestos a diversos tóxicos (17.15%), con exposición a termogénicos (21.1%), vida sedentaria (15.8%), así como en los pacientes con varicocele (16.05%).

**Conclusiones.** El porcentaje de fragmentación del ADN espermático fue mayor en el grupo de pacientes cuya muestra no fue capacitada y que tuvieron exposición a los factores de riesgo tales como alcoholismo, exposición a tóxicos ambientales, sedentarismo y varicocele.

**Palabras clave:** fragmentación, ADN espermático, infertilidad masculina.

## II. SUMMARY

**Introduction.** Infertility represents an important clinic problem; current data suggest that at least one by four couple who searching for a pregnancy, suffer many difficulties to get it. Many researches reports like prevalent causal factor, seminal defects. Despite information that offers the sperm analysis, approximately 10 to 15% of infertile men have normal conventional parameters. At last decades, laboratory had including biochemical markers assays, like sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation or chromatin analysis. About 10% of fertile men sperm and 20 to 25% of infertile men sperm, have detectable levels of sperm DNA damage. Sperm DNA integrity is essential for adequate genetic code transmission, and is considerate a spermatogenesis integrity and male fertility potential indicator.

**Material and methods.** This thesis is the first part of a prospective study; we included 30 male patients who come to fertility clinic by male infertility, from 2007 to 2008. We analyzed sperm DNA fragmentation like a cause of male infertility. We use COMET assay for this. We have two groups; first, 17 patients whose seminal sample was capacitated, and, second group, 13 patients whose seminal sample was not capacitated. We analyzed sperm DNA percentage and environmental factors influence, like smoking habit, alcoholism, obesity, sedentary lifestyle, hyperthermia, industrial toxic exposure and varicocele.

**Results.** Age average was 42.5 years; 4 to 30 patients (13.6%) had history of exposure to many toxic factors; 5 to 30 patients (16.6%) had antioxidant treatment; 6 to 30 patients (20%) was diagnosed with varicocele. 100% of seminal samples showed abnormal parameters in seminal analysis; 22 of 30 patients (73.4%) registered oligoastenoteratozoospermia and in 8 patients (26.6%) we observed astenoteratozoospermia. 17 of 30 seminal samples (56.6%) was capacitated. 96.6% of seminal samples showed percentages of sperm DNA fragmentation higher than 5% (considering as normal), registered by olive tail moment fluorescence intensity. Mean sperm DNA fragmentation in global group was 14.7%. Mean percentage sperm DNA fragmentation was higher in the second group, more in patients who had history of alcoholism (15.8%), industrial toxic exposure (17.15%), hyperthermia exposition (21.1%), sedentary lifestyle (15.8%) and varicocele (16.05%).

**Conclusions.** Percentage of sperm DNA fragmentation was higher in the group of patients whose seminal sample was not capacitated and in patients who had history of risk factors exposure, like alcoholism, industrial toxic exposure, hyperthermia exposition, sedentary lifestyle and varicocele.

**Key words: fragmentation, sperm DNA, male infertility.**

### III. INTRODUCCIÓN

La infertilidad afecta a una de cada seis parejas durante su etapa reproductiva con alteraciones del factor masculino como origen principal de la misma. Alrededor del 25% de todos los pacientes infértiles son diagnosticados como idiopáticos con parámetros seminales normales. <sup>(3, 4, 5, 6, 7)</sup>

Investigaciones sistemáticas han mostrado que la estimación de la concentración, motilidad y morfología del espermatozoide esta fuertemente influenciada por factores subjetivos, por lo que se han hecho grandes esfuerzos para desarrollar métodos de laboratorio que sean objetivos. La cromatina espermática es una estructura compacta y altamente organizada, consistente en ácido desoxirribonucleico (ADN) y nucleoproteínas heterogéneas. La naturaleza condensada e insoluble de la cromatina protege la integridad genética durante el transporte del genoma paterno a través del tracto genital masculino y femenino. <sup>(2)</sup> Tradicionalmente, el diagnóstico de la infertilidad masculina ha dependido del análisis microscópico y los ensayos bioquímicos para determinar la calidad del semen humano. Los parámetros medidos convencionalmente son la concentración espermática, la motilidad y la morfología en el eyaculado. Estas pruebas son esenciales para proporcionar la información sobre la cual los clínicos basan su diagnóstico inicial, sin embargo, el valor clínico y predictivo de la infertilidad es cuestionable. Algunos laboratorios han desarrollado diversas técnicas de laboratorio para determinar aspectos específicos de la función espermática, esto incluye, parámetros de calidad del movimiento espermático, capacitación, inducción de reacciones del acrosoma e interacciones entre la zona pelúcida y el espermatozoide. Estos parámetros proporcionan un fuerte valor pronóstico y no son realizados de manera rutinaria. Existe aceptación general de que la prueba del ADN nuclear espermático demuestra ser la más prometedora en el diagnóstico y el tratamiento de la infertilidad masculina. Esto ha permitido el desarrollo de numerosas técnicas para estudiar la integridad del ADN espermático. <sup>(5)</sup>

Múltiples estudios han evaluado la estructura del ADN y su integridad en muestras de semen humano eyaculado, reportando un efecto negativo de altos porcentajes de fragmentación del ADN espermático sobre las tasas de embarazo en las técnicas de reproducción asistida. Estos estudios han sugerido que el ADN dañado puede servir como un marcador diagnóstico de un efecto paterno adverso para el desarrollo e implantación del embrión humano. Se han demostrado altos porcentajes de fragmentación del ADN espermático en pacientes sometidos a múltiples tratamientos fallidos de reproducción asistida sin haber podido encontrar una relación directa con el desarrollo morfológico del embrión. Los niveles elevados de fragmentación del ADN espermático se han asociado significativamente con un resultado negativo de embarazo. <sup>(8)</sup>



## IV. MARCO TEÓRICO.

### 4.1. Antecedentes.

El análisis de las características de muestras seminales es esencial para evaluar si el factor masculino tiene influencia en la fertilidad. Con esta finalidad, la Organización Mundial de la Salud, ha establecido una serie de parámetros a evaluar en el laboratorio de Andrología.<sup>(11, 12)</sup> Entre las características convencionales que se determinan habitualmente, destacan el volumen del eyaculado, el pH, el número de espermatozoides por unidad de volumen, la motilidad y la morfología de los espermatozoides.<sup>(12)</sup>

Existen algunos parámetros del análisis seminal convencional que son sugerentes de estrés oxidativo patológico, como son pobre motilidad, teratozoospermia, leucocitos elevados y aumento de la viscosidad.<sup>(13,14)</sup> Sin embargo, aún utilizando este tipo de valores se estima que aproximadamente un 15% de los varones infértiles presentan un seminograma normal; al evaluar otros parámetros, tales como la integridad del acrosoma, la vitalidad, la integridad de la membrana, la conclusión a la que se llega es que ningún parámetro, *per se*, se puede considerar de valor diagnóstico absoluto de la infertilidad masculina. La situación es más crítica todavía cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (Fertilización In Vitro o Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide), en donde se requiere un mayor control que en ciclos de baja complejidad.<sup>(14)</sup>

Parece lógico asumir que la transferencia de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al óvulo, es crucial para conseguir una fecundación con ciertas perspectivas de éxito. Sin embargo, resulta sorprendente que no exista una tecnología rápida para analizar la calidad del ADN en una célula tan crítica, como lo es el espermatozoide.

Existen diversos factores, como el hábito tabáquico, el sedentarismo, la exposición a tóxicos ambiental o laboral, además de otras condiciones médicas, como la obesidad y el varicocele, que se relacionan con parámetros seminales anormales y un porcentaje mayor de fragmentación del ADN espermático.

Se han desarrollado diversos ensayos para analizar la integridad del ADN y la cromatina espermática, utilizando microscopía de fluorescencia, con más interacciones ADN/cromatina específicas para identificar con mayor exactitud los defectos en la cromatina o el ADN.<sup>(15)</sup> Algunas de ellas son TUNEL (terminal, deoxynucleotidyl transferase – mediated nick end labeling), SCSA (sperm chromatin structure assay), SCD (sperm chromatin dispersión) y COMETA (single cell gel electrophoresis assay). Para el ensayo COMETA, los espermatozoides son suspendidos en una delgada capa de gel de agarosa sobre un portaobjeto, son lisados, procesados por electroforesis y teñidos con un tinte fluorescente. Las hebras rotas de ADN sueltan el sobreenrollamiento de la misma y permite la migración del ADN fragmentado hacia la región del ánodo proyectando una imagen en cometa. Los espermatozoides con altos niveles de ruptura de las hebras de ADN tienen mayor intensidad de la cola del cometa y la longitud de la misma.<sup>(2)</sup> Un estudio COMETA realizado con la variedad alcalina (pH 13), mostró que el 20% del total de la fluorescencia del ADN se observa en la cola del cometa, lo que es significativamente mayor que el 5% característico del nivel basal de ruptura en las células somáticas. La longitud de la cola se incrementa en respuesta al daño del ADN, reflejándose en la intensidad de la fluorescencia.<sup>(2)</sup>

## 4.2. Espermatogénesis.

La espermatogénesis incluye tres procesos: la multiplicación de las células germinales, la reducción del número de cromosomas de un estadio diploide a un haploide (por medio de la meiosis) y la formación de una súper estructura que genera energía para promover la motilidad y la protección del conjunto cromosómico contra el daño de los agentes ambientales. Para el segundo mes después de la embriogénesis, después de la migración de las células germinales a la cresta genital, el número total de células germinales por gónada es de 300 000. Para la pubertad este número se incrementa a cerca de 600 millones de espermatogonias por testículo. Como resultado de los acontecimientos hormonales que acompañan a la pubertad, se origina una profunda diferenciación celular, lo que resulta en la producción de 100 millones de espermatozoides al día desde la pubertad hasta la tercera edad, lo que constituye un total de más de tres trillones de espermatozoides durante el periodo de la vida reproductiva. La espermatogénesis es el proceso de desarrollo y maduración de las células germinales dentro de los túbulos seminíferos, los cuales son pequeños tubos localizados dentro de cada testículo. En los túbulos seminíferos se encuentran las células de Sertoli, cuya función es la creación de un sitio inmunológicamente privilegiado para el espermatozoide en formación, para que no sea reconocido como célula extraña al organismo por su contenido haploide, y a la vez le proporciona un micro ambiente favorable a través de una permeabilidad muy selectiva. Las células germinales proliferan y se diferencian en espermatozoides dentro de la pared de los túbulos seminíferos. Las células de Sertoli suministran además los factores de nutrición para el metabolismo de las células germinales.

El desarrollo de los espermatozoides se origina con las espermatogonias indiferenciadas o células madre que son de dos tipos:

- Espermatogonias A: Son las células indiferenciadas que requieren cinco procesos mitóticos para llegar a la formación de espermatogonias B y otro grupo se divide para formar más espermatogonias A, lo que le permite al varón producir espermatozoides hasta una edad muy avanzada
- Espermatogonias B: Se dividen por mitosis para producir espermatoцитos primarios, los cuales se reproducen por meiosis para producir espermatoцитos secundarios. El reacomodo de la información genética se realiza en esta etapa. Subsecuentemente, una segunda división meiótica ocurre, durante la cual el número de cromosomas se divide. La célula resultante se denomina espermátide, una mitad de éstas lleva el cromosoma X y la otra mitad lleva el cromosoma Y. Las espermátides se transforman en espermatozoides por medio de varios cambios morfológicos conocidos como espermiogénesis, el ADN se condensa, se realiza el cambio de histonas a protaminas, se forma la vesícula acrosómica que se convierte en el acrosoma, el citoplasma emigra hacia la parte media y la pared celular de la espermátide se colapsa. Finalmente, el espermatozoide se libera en el túbulo seminífero. El proceso completo de la espermatogénesis requiere 70 a 74 días y el transporte de las células espermáticas de los testículos a las vesículas seminales requiere 12 a 21 días más. <sup>(16)</sup> (Figura 1 y 2)

Figura 1. Esquema descriptivo de la espermatogénesis.

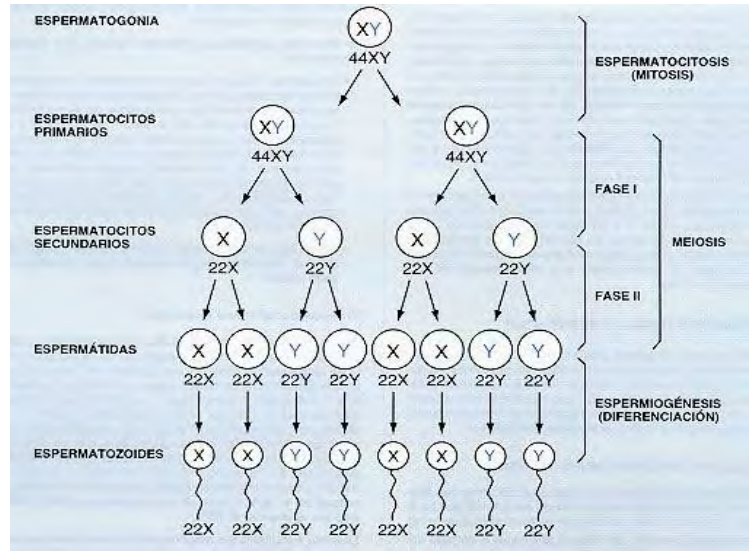
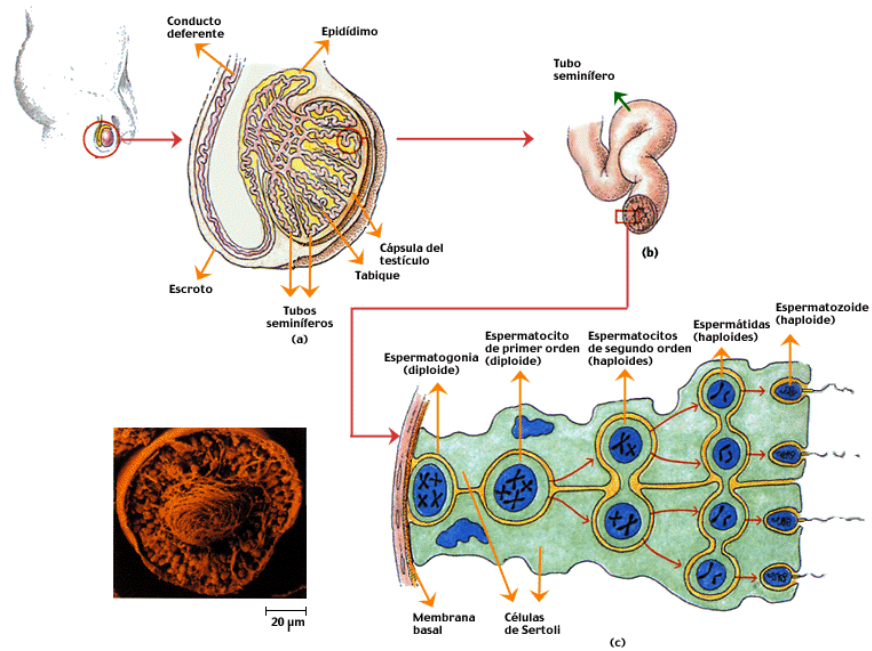


Figura 2. Esquema de la espermatogénesis y anatomía de los genitales masculinos.



### 4.3. Causas de la infertilidad masculina

Existen múltiples causas de la infertilidad masculina, las cuales se muestran en la tabla 1. (12, 17, 18)

Tabla 1. Causas de infertilidad masculina

ETIOLOGÍA	PORCENTAJE
Factores sexuales	1.7%
Infecciones Urogenitales	6.6%
Anomalías genéticas	2.1%
Factores adquiridos	2.6%
Varicocele	12.3%
Endocrinopatías	0.6%
Factores inmunológicos	3.1%
Otras anomalías	3%
<b>Causas idiopáticas</b>	<b>75.1%</b>

### 4.4. Factores de riesgo asociados con la fragmentación del ADN espermático

El daño al ADN espermático es multifactorial y puede ser debido a múltiples condiciones ambientales tales como quimioterapia, radioterapia, algunos medicamentos, contaminación del aire, tabaquismo, pesticidas, químicos, calor, técnicas de reproducción asistida, protocolos de capacitación espermática, entre otros. (2, 8, 9, 10)

Se debe investigar los factores de riesgo para esta entidad durante la historia clínica, ya que constituyen la base diagnóstica.

**Toxicomanías.** Tabaquismo, alcoholismo, uso de cocaína y anabólicos esteroideos, altas dosis de cafeína, marihuana. (10)

- **Alcoholismo:** Se ha encontrado que el etanol tiene efectos apoptóticos en diferentes tejidos y líneas celulares. El consumo crónico de alcohol en animales de experimentación ha demostrado cambios de marcada degeneración, tales como daños a las células germinales, espermatogénesis defectuosa, hipogonadismo e infertilidad. Las células de Sertoli han sido consideradas como las células blanco primarias de la toxicidad del alcohol, provocando vacuolización de las mismas (10)
- **Tabaquismo:** Se asocia a un 48% de incremento en la concentración de leucocitos en semen, con un 107% de incremento en los niveles de las especies reactivas de oxígeno. (13, 18) Se asocian fuertemente al tabaquismo, propiedades mutagénicas y pobre calidad espermática, específicamente, una reducción severa de la cuenta y la motilidad, observando en el examen seminal un alto índice de formas espermáticas anormales. (19)

**Infecciones genitourinarias:** Las infecciones virales provocan fragmentación del ADN espermático debido a que desencadenan altos niveles de estrés oxidativo, tal como ocurre en infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), herpes simple, virus

Epstein Baar, Hepatitis B o C. Otros patógenos involucrados en el estrés oxidativo infeccioso son la Chlamydia trachomatis, Ureaplasma, Mycoplasma, incluso algunos que no se transmiten por vía sexual como son Estafilococo epidermidis o Escherichia coli. <sup>(13)</sup>

**Quimioterapia.** El cisplatino es un agente quimioterapéutico importante en el tratamiento del carcinoma testicular, inhibe el crecimiento del tumor a través la activación de genes que provocan apoptosis. <sup>(10)</sup>

**Hipertermia.** Uso frecuente de jacuzzi, sauna o exposición laboral a altas temperaturas ambientales. La hipertermia induce mayor apoptosis mediante daño directo a las mitocondrias y retículo endoplásmico de las células germinales. <sup>(10)</sup>

**Radiación.** Induce apoptosis a través de múltiples vías generadoras de especies reactivas de oxígeno y también por activación de genes inductores de apoptosis. <sup>(10)</sup>

**Medicamentos.** Nitrofurantoína, cimetidina, sulfasalazina, espironolactona, alfa bloqueadores, agentes alquilantes, alopurinol, antipsicóticos, aspirina en altas dosis, colchicina, fenitoína, antidepresivos tricíclicos, ácido valpróico. <sup>(10)</sup>

**Criopreservación.** Se ha demostrado que la criopreservación activa las caspasas y las diversas vías de apoptosis en el espermatozoide humano. <sup>(10)</sup> La criopreservación se acompaña de daño a una variedad de organelos del espermatozoide debido a la formación de cristales de hielo intracelulares, deshidratación celular y daño osmótico. <sup>(21)</sup> Se ha demostrado que el espermatozoide criopreservado de hombres infértiles sufre daño al ADN, no así el espermatozoide de hombres fértiles; sin embargo, otros estudios han permitido demostrar que sí existe daño al ADN espermático después de los cambios en la membrana celular inducidos por la descongelación. Edelstein y colaboradores no encontraron daño al ADN espermático después de un largo periodo de criopreservación comparado con periodos cortos. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden explicar el deterioro del semen por los procedimientos de congelación y descongelación las cuales, como es bien sabido, generan la producción de éstos. <sup>(21)</sup> Se ha demostrado que la criopreservación incrementa la fragmentación del ADN espermático tanto en varones con concentración espermática normal como en aquellos con baja concentración, lo cual puede aportar información importante sobre el pronóstico de la muestra seminal después de la descongelación. <sup>(6, 7, 22)</sup>

**Capacitación espermática.** Existe evidencia que señala que las muestras espermáticas, cuando se centrifugan, se generan altos niveles de ROS e irreversible daño al espermatozoide, disminuyendo con esto el potencial de espermatozoides móviles <sup>(2)</sup>.

#### **4.5. Fragmentación del ADN como proceso fisiológico.**

A niveles fisiológicos, las especies reactivas de oxígeno (ROS) modulan la actividad génica y protéica que son vitales para la proliferación espermática, su diferenciación y función. Sin embargo, en altos niveles, los ROS están implicados en el daño a la estructura de la cromatina provocando actividad anormal, apoptosis y necrosis celular. <sup>(2)</sup> Niveles fisiológicos de apoptosis son necesarios para regular la proliferación de las células germinales. La apoptosis se caracteriza por una condensación de la fragmentación de la cromatina nuclear, compactación de los organelos citoplasmáticos, dilatación del retículo endoplásmico, disminución del volumen celular y alteraciones de la membrana celular; estos cambios resultan en el reconocimiento y la fagocitosis de las células apoptóticas. <sup>(10, 23)</sup> Durante la espermatogénesis, las protaminas (las cuales tienen la mitad del tamaño de las

histonas), reemplazan a las histonas; durante el paso del espermatozoide a través del epidídimo, las protaminas reducen la cromatina a una sexta parte del volumen dentro de las células somáticas. Esta compactación densa le brinda la protección al espermatozoide y una relativa resistencia al daño por la peroxidación normal.<sup>(5)</sup> Los errores en estos procesos pueden volver al ADN más susceptible al daño, especialmente debido a la acción de los ROS.<sup>(4, 5)</sup> El plasma seminal provee mecanismos de defensa a través de tres niveles: prevención, intercepción y la reparación. El plasma seminal contiene un número de antioxidantes enzimáticos tales como la catalasa y glutatión peroxidasa. Contiene además una variedad de antioxidantes no enzimáticos como ascorbato, urato, alfa tocoferol, piruvato glutatión, taurina, hipotaurina.<sup>(7)</sup> Los espermatozoides humanos son capaces de generar cantidades bajas y controladas de especies reactivas del oxígeno (ROS) endógenos, que juegan un papel importante en la inducción de la capacitación espermática, la reacción acrosómica y la adquisición de la habilidad de fertilizar. Normalmente existe un balance entre la generación de radicales libres y los sistemas de rescate. Sin embargo, la alta generación de los ROS por los espermatozoides inmaduros y anormales, contaminación por leucocitos, procesos realizados al espermatozoide (centrifugación excesiva, criopreservación y descongelación), se acompaña por una disminución en los procesos de rescate y de los niveles de antioxidantes en el suero, plasma seminal y/o medios de cultivo espermático, lo cual induce a un estado de estrés oxidativo.<sup>(7, 24)</sup>

Muchos estudios han sugerido procesos tales como la hiperactivación, capacitación, penetración del esperma a la zona pelúcida y la reacción acrosomal, que pueden estar regulados por reacciones de oxidación y reducción.<sup>(3)</sup> Una especie reactiva al oxígeno, el peróxido, esta implicada en el movimiento de hiperactividad necesario para que el espermatozoide atraviese el tracto genital femenino y las células del cúmulo, permitiendo su entrada a través de la zona pelúcida.<sup>(2)</sup> El espermatozoide es susceptible al daño oxidativo debido a la extrusión del citoplasma rico en antioxidantes durante la maduración espermática, así como la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática.<sup>(2, 5)</sup> A pesar de que la reparación del ADN ocurre durante la espermatogénesis la cual termina con la transcripción y la translación post – espermatogénesis, el espermatozoide no tiene un mecanismo de reparación del ADN dañado durante su tránsito por el epidídimo o posterior a la eyaculación.

#### **4.6. Fragmentación del ADN como proceso patológico.**

Los espermatozoides están sometidos a ciertos niveles de estrés oxidativo y son susceptibles al daño oxidativo, especialmente cuando el nivel de protección antioxidante son bajos, ya sea en el plasma seminal o durante las técnicas de reproducción asistida.<sup>(7)</sup> Los altos niveles de ROS (superóxido, hidroxilo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrilo) ponen en peligro la motilidad espermática, su viabilidad y la función de interacción con la membrana lipídica, proteínas, núcleos y ADN mitocondrial. La posible explicación del proceso dañino se basa en el hecho de que las membranas espermáticas de los mamíferos son ácidos grasos poli insaturados, que les confiere mayor susceptibilidad al daño peroxidativo inducido por los radicales libres.<sup>(7, 25)</sup> Cuando los ROS atacan la doble unión asociada con los ácidos grasos insaturados, se inicia una cadena de reacciones de peroxidación lipídica que, si no es detenida, afecta la integridad de la cromatina espermática y causa la alta frecuencia de la ruptura de las hebras del ADN. Cuando los ROS atacan la bicapa lipídica celular, inicia la autocatálisis resultando en la formación de

hidroperóxidos y otros productos tales como el malonaldehído (MDA) y agentes alquilantes con la habilidad de unirse covalentemente a los grupos nucleofílicos del ADN, péptidos y proteínas, modificando su función molecular. <sup>(4)</sup> La peroxidación en las proteínas altera la estructura y función de los espermatozoides, incrementando la susceptibilidad de ser atacados por los macrófagos, afectando además la fosforilación y la generación del adenosín trifosfato (ATP) con una profunda repercusión a su potencial de fertilización. <sup>(7)</sup> El daño peroxidativo iniciado por la generación de altos niveles de ROS durante el estrés oxidativo observado en los espermatozoides de hombres infértiles, se asocia no solo con una pérdida de la función de la membrana sino también la apariencia del daño al ADN localizado en la cabeza espermática, llevando a una alta incidencia de rompimiento de las hebras del ADN. <sup>(2, 24, 27)</sup>

Si el daño al ADN espermático detectado en muestras de semen eyaculado esencialmente inicia después de la secreción espermática por las células de Sertoli, puede sustentarse la hipótesis que el grado de daño se incrementa después de dicha secreción, por lo tanto, el espermatozoide obtenido directamente del testículo se observaría menos afectado por este proceso patológico cuando se compara con la muestra de espermatozoides eyaculados. Estos hallazgos sugieren que realizar ICSI con espermatozoides obtenidos del testículos, ofrece una opción viable de tratamiento en reproducción asistida para hombres con altos niveles de daño al ADN espermático. <sup>(7, 28)</sup>

#### **4.7. Papel de las caspasas en la fragmentación del ADN espermático.**

La muerte celular programada (apoptosis) ocurre en el epitelio seminífero durante el desarrollo de los testículos en mamíferos. La fragmentación del ADN, el cual es uno de los puntos finales esenciales de la apoptosis, es un hallazgo frecuente en las células germinales. En la mayoría de los tipos celulares, el mecanismo de la apoptosis es la respuesta de la fragmentación del ADN, lo cual involucra una familia de cisteín – proteasas intracelulares (caspasas). La apoptosis de las células germinales masculinas *in vitro* se puede evitar mediante la inactivación de las caspasas. <sup>(8, 29)</sup> Las caspasas (proteinasas cisteín – aspartato específicas) juegan un papel central en la regulación de la apoptosis en el epitelio seminífero humano. Se encuentran en forma de proenzima expresadas como inactivas y participan en la respuesta de cascada iniciada por las señales pro – apoptosis. Se han documentado 14 caspasas implicadas en la vía de apoptosis humana. La caspasa 3 se considera la de mayor actividad de tipo proteasa. La adecuada regulación de la cascada de caspasas juega un papel importante en la diferenciación espermática y su maduración testicular. Sin embargo, las caspasas están implicadas en la patogénesis de múltiples patologías andrológicas como defectos de la espermatogénesis, disminución de la motilidad y niveles incrementados de fragmentación del ADN, torsión testicular, varicocele e infertilidad inmunológica. <sup>(10)</sup> Se ha demostrado que la activación de las caspasas y la fragmentación del ADN son fenómenos frecuentes en las células germinales de hombres con azoospermia no obstructiva, especialmente en casos de arresto en la maduración en la etapa de meiosis o post meiosis. La estrecha asociación de las células germinales caspasa positivas con las células de Sertoli sugieren un papel activo de éstas en la apoptosis caspasa – dependiente de las células germinales y en la subsecuente eliminación de las células apoptóticas. <sup>(10, 29)</sup> Greco y colaboradores, recientemente han demostrado que la señal de muerte celular clásica en la cual hay activación de la caspasa seguida por la externalización

de la fosfatidilserina, marca a la célula como un blanco para la fagocitosis. Esta activación en las células germinales tiene una estrecha asociación con las células de Sertoli. Después de su liberación desde las células de Sertoli, espermátides y espermatozoides, parecen sufrir un daño en su ADN, independientemente de las vías usuales de señalización de muerte celular. Las investigaciones futuras de este aspecto puede mejorar el entendimiento de la regulación por las caspasas, lo que puede ayudar a manipular la maquinaria de la apoptosis para lograr beneficios terapéuticos. <sup>(5, 10)</sup>

#### **4. 8. Papel del varicocele en la fragmentación del ADN espermático.**

El varicocele ocurre en aproximadamente el 15 al 20 % de la población masculina general, especialmente en adolescentes. Ocurre en el 19 al 41% de los hombres que se han sometido a tratamientos de infertilidad y en alrededor del 80% de los hombres con infertilidad secundaria. <sup>(8, 30)</sup> La apoptosis disminuye en el testículo de hombres afectados por varicocele, sin embargo, generan una alta concentración de especies reactivas de oxígeno debido a hiperoxidación. <sup>(10)</sup> Esta anomalía anatómica es quizá una de las causas más comunes de pobre producción espermática y baja calidad del semen. Los efectos del varicocele en la calidad espermática y la cantidad, son difíciles de definir y predecir. Una elevación de la temperatura escrotal causado por circulación alterada parece ser el mayor defecto. <sup>(30)</sup>

Una alta frecuencia de células espermáticas con fragmentación del ADN se ha reportado en el eyaculado de sujetos con varicocele, en comparación con donadores fértiles. Un incremento de las especies reactivas de oxígeno resultantes del estrés oxidativo, lo cual causa peroxidación de la membrana plasmática espermática y daño al ADN nuclear. El óxido nítrico secretado por las células endoteliales desde las venas espermáticas dilatadas y el peroxinitrito generado por esta reacción con los radicales de súper óxidos es probablemente la fuente más importante de daño oxidativo. <sup>(30)</sup> Las muestras seminales de pacientes con varicocele muestran una proporción significativamente mayor de células espermáticas con ADN fragmentado que aquellas muestras de hombres fértiles. La mayoría de las muestras de pacientes con varicocele muestran parámetros anormales en el examen seminal. <sup>(30)</sup> El estudio realizado por Enciso y colaboradores muestra que la frecuencia de células espermáticas con fragmentación del ADN es casi dos veces mayor que en hombres fértiles. En pacientes con varicocele no sólo hay daño al ADN sino también a las proteínas, especialmente aquellas de la matriz nuclear, desarrollándose un estado lítico avanzado. <sup>(30)</sup> El incremento de las especies reactivas al oxígeno (ROS) a nivel seminal se ha observado que está correlacionado con el grado de varicocele. Este es un factor bien conocido que puede inducir fragmentación del ADN tanto *in vivo* como *in vitro*. El óxido nítrico y el peroxinitrito, potentes oxidantes, se ha demostrado que se producen en una alta concentración en las venas espermáticas dilatadas. <sup>(30)</sup>

Werthman y colaboradores realizaron un estudio en 11 varones con varicocele y altos niveles de fragmentación del ADN espermático, a quienes se les realizó varicocelectomía y revaloración el nivel de fragmentación del ADN espermático de 4 a 6 meses posteriores a la cirugía, observando que 90% de los pacientes mostraron una disminución del porcentaje de fragmentación del ADN espermático dentro de los primeros 3 a 6 meses después de la varicocelectomía. La reparación de un grado III de varicocele resulta en un gran porcentaje de cambios del índice de la fragmentación del ADN espermático. <sup>(8)</sup> Recientemente, Zinni y colaboradores encontraron una ligera disminución de la fragmentación del ADN



espermático posterior a realizar varicocelectomía. Todo esto puede ser de gran interés para valorar si la varicocelectomía disminuye la frecuencia de las células espermáticas con fragmentación del ADN como han reportado actualmente algunos autores, aunque existe debate en este sentido.<sup>(30)</sup> A pesar de que puede parecer optimista el pensar que la varicocelectomía puede disminuir la fragmentación del ADN espermático, pero se ha demostrado que no todos los pacientes se benefician de la mínima invasión durante el procedimiento de varicocelectomía.<sup>(8)</sup>

#### 4.9. Técnicas para el análisis del ADN espermático.

Existen dos estrategias diferentes para estudiar la fragmentación del ADN espermático. La primera incluye aquellas metodologías encaminadas a marcar las rupturas, tanto de la cadena sencilla como de la cadena doble que se registran de manera natural o fortuita en la molécula del ADN, en éste grupo podríamos incluir el uso de procesos enzimáticos para la incorporación in situ de nucleótidos marcados, tales como la Terminal dUTP Nick – End – Labeling (TUNEL) o la In Situ Nick Translation (ISNT). Dado que las rupturas del ADN aumentan la desnaturalización, al iniciarse ésta a partir de los extremos de la ruptura. La segunda estrategia incluye aquellas tecnologías que miden la distinta capacidad de la cromatina y en especial del ADN para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. En este grupo se incluyen técnicas tales como el Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). El ADN Breakage Detection Fluorescent In Situ Hybridation (DBD – Fish), una metodología que utilice la hibridación in situ de ácidos nucleicos. El ensayo COMETA, con condiciones desnaturalizantes o la prueba de Sperm Chromatin Dispersion (SCD)<sup>(31)</sup>.

- **TUNEL** (terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated nick end labeling): Se realiza con microscopio de fluorescencia y citometría de flujo. Se incorporan los nucleótidos marcados a un fluorocromo en los extremos de las rupturas existentes en las hebras del ADN, la reacción se logra con una transferasa terminal, técnicamente, la señal del marcado obtenida por cada espermatozoide, se incrementaría de acuerdo al número de rupturas que presente la cadena de ADN<sup>(31, 32)</sup>. La técnica ha tenido buena aceptación, se comercializa en un kit. Existen niveles de marcado intermedio de la molécula del ADN e irregulares, o bien niveles de base variable que pueden presentar cierta confusión. Su uso no se ha extendido en la rutina clínica por tres razones: requiere de equipo sofisticado, requiere personal especializado y el material que se utiliza viene precedido por un proceso de fijación de la cromatina, que puede dificultar el acceso a las enzimas y la propia actividad enzimática puede ser irregular.<sup>(31, 33)</sup>
- **SCSA** (sperm chromatin structure assay): Se utiliza citometría de flujo. Se desnaturaliza la molécula de ADN mediante solución ácida y posteriormente se marca con naranja de acridina, la cual se intercala entre las dos cadenas de ADN, se produce desnaturalización y emite longitudes de onda, visualizándose en color rojo la fracción mayormente desnaturalizada<sup>(32)</sup>. El grupo del Dr. Evenson ha establecido que individuos con un porcentaje de fragmentación en el ADN alrededor del 30% o superior, presentan problemas de infertilidad. Si bien esta técnica es de las más usadas, mide el daño en una sola cadena del ADN, además de

que no es una técnica accesible a la mayoría de los laboratorios por el equipo de citometría de flujo que requiere. <sup>(31)</sup>

- **SCD** (sperm chromatin dispersión): Se utiliza microscopio de fluorescencia en campo claro. Se somete a tratamiento ácido y desproteización formando halos de dispersión de la cromatina dependiendo de la formación de bucles de ADN. Si no se forman halos se considera que el ADN está fragmentado <sup>(32)</sup>. Esta técnica tiene la ventaja de que la interpretación de los resultados no requiere la determinación de color, ni determinación de fluorescencia, no necesita de equipo complejo, pero no muestra una correlación tan importante como SCSA, TUNEL o COMET. <sup>(31, 34)</sup>
- **COMETA** (single cell gel electrophoresis assay): Se realiza por microscopía de fluorescencia y electroforesis del ADN. Se incluyen espermatozoides en un microgel de agarosa, se someten a lisis, los núcleos se desproteizan y se someten a electroforesis. El ADN fragmentado avanza por acción del campo eléctrico proyectando una imagen semejante a un cometa. <sup>(32)</sup>

#### 4. 10. Ensayo COMETA para el análisis de la fragmentación del ADN espermático

Los parámetros de evaluación utilizados con mayor frecuencia para el estudio del ADN espermático en el ensayo COMET son:

- Longitud de la cola: es la distancia de la migración del ADN desde el cuerpo del núcleo hasta el final de la misma y es usado para evaluar la extensión del daño del ADN
- Intensidad de la fluorescencia de la cola: (olive tail moment, OTM, tail length) se define como el producto de la longitud de la cola y la fracción del ADN total en la cola. Incorpora una medida tanto de la fracción más pequeña detectable de la migración del ADN (reflejado en la longitud de la cola del cometa) así como del número de las hebras rotas o relajadas, representado por la intensidad del ADN en la cola. <sup>(5)</sup>

Se utilizan las siguientes fórmulas:

1) Longitud de la cola = Extensión de la cola

(Cola medida desde el núcleo) Extensión de la cola + Extensión de la cabeza / 2

2) Intensidad de la cola = (media de la cola – media de la cabeza) x %ADN cola/100

Extensión de la intensidad de la cola = longitud de la cola x %ADN cola /100

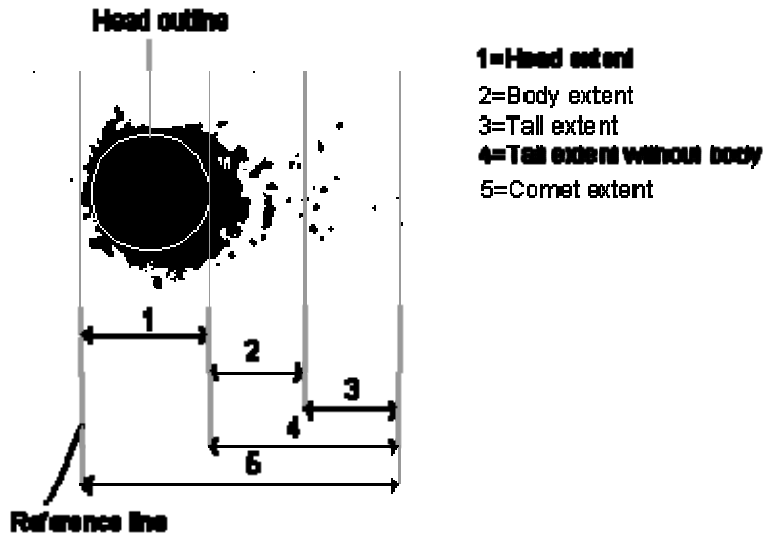
3) % ADN cabeza

Intensidad de cabeza / Intensidad de la cabeza + Intensidad de la cola)) x 100

4) % ADN de la cola = 100 - % ADN cabeza

(5, 13)

Figura 3. Proyección en cometa de la fragmentación del ADN espermático

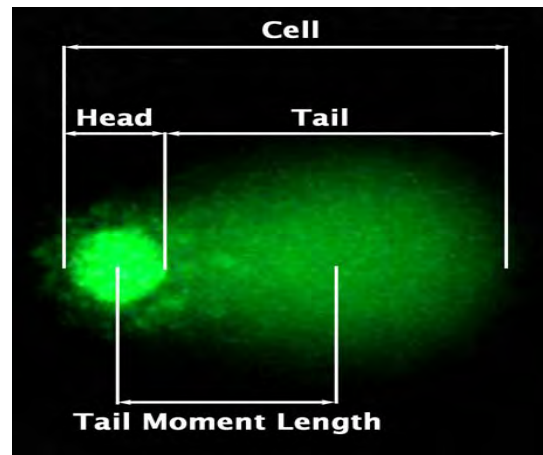


Los valores considerados normales no se han establecido con exactitud, el coeficiente de variación va del 0 al 3% para los parámetros de la densidad de la cabeza y del 0 al 5% para los parámetros de la cola (longitud e intensidad).<sup>(20, 35)</sup>

La OTM es expresada en unidades arbitrarias. Cada uno de estos parámetros, describe de manera endógena el daño del ADN correspondiente a las hebras del ADN rotas y/o los sitios lábiles a la alcalinidad de las mismas.<sup>(5)</sup>

La idea de éste ensayo es que el ADN de un núcleo desproteínizado que contenga rupturas en sus cadenas del ADN, estará más libre para ser movilizado hacia el polo positivo cuando éste se somete a un campo eléctrico. 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 caracteriza un agente reductor de los grupos sulfidrílo que se encuentran en las protaminas del espermatozoide. Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sustancias fluorescentes, de esta forma, el fragmento se desplaza generando una imagen similar a la de un cometa. Aquellos espermatozoides con su ADN íntegro no generan esta imagen o solo producen imágenes de discretas colas de cometa, mientras que aquellos núcleos que tienen un ADN dañado muestran un claro desplazamiento de los múltiples fragmentos del ADN.<sup>(31)</sup> (Figura 4)

Figura 4. Estructura de la proyección en cometa de la fragmentación del ADN espermático.



Existen dos variedades de este ensayo, alcalino y neutro. El ensayo alcalino (pH mayor de 10), desnatura el ADN del espermatozoide y por lo tanto la ruptura de una sola hebra como de las dos hebras de ADN.<sup>(2)</sup>

Hughes y colaboradores encontraron, adicionalmente, que cuando el daño al ADN se incrementa debido a la exposición a rayos X y niveles altos de peróxidos, las muestras con astenozoospermia son más susceptibles al daño que las muestras de hombres infértiles normoespérmicos, quienes, a su vez, son más susceptibles al daño que las muestras de hombres fértiles normoespérmicos.<sup>(2)</sup> La variedad alcalina de este ensayo sirve también para demostrar como el tratamiento previo con el ácido ascórbico, alfa tocoferol y urato protegen al ADN del daño inducido por los rayos X, sin embargo, el tratamiento previo con solo acetil cisteína, o combinaciones de ascorbato y alfa tocoferol resultan en mayor daño al ADN cuando hay exposición a la irradiación de rayos X.<sup>(2)</sup> La variedad neutral del ensayo puede ser más sensible para detectar el doble rompimiento de las hebras del ADN y por lo tanto, ser más capaz de identificar el daño al ADN relacionado con la infertilidad por las condiciones de este ensayo, que no desnatura al ADN, detecta fácilmente el rompimiento tanto de ambas hebras de ADN como de una sola. De esta manera, la longitud de la cola del cometa se incrementa en respuesta al daño del ADN más en relación a la intensidad fluorescente fuera del núcleo.<sup>(2)</sup>

#### **4. 11. Influencia de la fragmentación del ADN sobre la calidad espermática.**

La producción espermática normal, su maduración, progresión (para un efectivo transporte a través del tracto genital femenino) y su función (capacitación, reacción del acrosoma, penetración del ovocito, descondensación de la cabeza), son procesos complejos pero esenciales para lograr la fertilización, el embarazo y el desarrollo embrionario temprano.<sup>(7, 20)</sup> Existe una correlación significativa entre el porcentaje de fragmentación del ADN espermático y las características básicas espermáticas como motilidad, morfología y concentración.<sup>(9, 18, 20, 36, 37)</sup> El daño al ADN en las células germinales masculinas se ha asociado con pobre calidad espermática, bajos índices de fertilidad, pobre tasa de

implantación, altas tasas de aborto y alto índice de enfermedades al nacimiento.<sup>(38)</sup> Se han realizado análisis simultáneos de la fragmentación del ADN espermático y cromosopatías en las mismas células espermáticas y se demostró una alta frecuencia de fragmentación del ADN en los espermatozoides que contenían aneuploidías cromosómicas sexuales que se originan tanto en la primera como en la segunda división meiótica.<sup>(7, 21, 39)</sup> Los datos antes observados pueden sugerir que la ocurrencia de aneuploidías durante la maduración espermática, lo que permite el desarrollo de la fragmentación del ADN espermático, originando espermatozoides genéticamente inactivos; en otras palabras, la maduración espermática completa a través del daño del ADN puede actuar como un selector biológico de la calidad espermática utilizando para ello la técnica SCD.<sup>(7)</sup> El análisis de la fragmentación del ADN en los espermatozoides testiculares con defecto en la espermatogénesis (azoospermia no obstructiva) fue significativamente mayor que en los hombres con producción espermática testicular normal (azoospermia obstructiva). Este estudio sugiere que en hombres infértiles con azoospermia la incidencia de daño al ADN en poblaciones de espermatozoides testiculares es mucho menor, lo que confirma la hipótesis de que el daño al ADN espermático ocurre a nivel post testicular durante las fases de desarrollo temprano observando un genoma espermático anormal con apoptosis predominante en hombres con espermatogénesis defectuosa. La producción de fragmentación del ADN espermático post testicular puede tener su origen en un exceso de estrés oxidativo y esto quizá sea predominante en los conductos epididimarios de algunos pacientes. Tanto la apoptosis como el estrés oxidativo pueden actuar sinérgicamente para causar este daño.<sup>(21, 28, 40)</sup>

#### **4. 12. Fragmentación del ADN espermático y desarrollo embrionario.**

La fertilización puede ser independiente de la integridad del ADN espermático, pero el desarrollo post fertilización del embrión puede ser seriamente alterado por este daño. Después del tercer estadio de clivaje, el genoma paterno ejerce una mayor influencia y el daño al ADN se refleja directamente en el desarrollo embrionario. En ciclos de reproducción asistida, el desarrollo preimplantación esta negativamente correlacionada con el daño del ADN espermático demostrado a través de las diferentes técnicas aplicadas a este fin.<sup>(5)</sup> Un espermatozoide con defectos del ADN puede fertilizar un ovocito, producir incluso un embrión de adecuada calidad durante su desarrollo, pero, si el defecto del ADN es extenso, se produce una falla en la implantación.<sup>(2, 39)</sup> Diversos estudios han reportado que el espermatozoide con daño del ADN tiene la habilidad de fertilizar al ovocito, pero el desarrollo embrionario subsecuente se relaciona con el grado de daño al ADN. Bajo circunstancias normales, el daño del ADN dentro del cigoto por la fertilización de un espermatozoide dañado, es probable y efectivamente reparado por el ovocito, sin embargo, es posible que la capacidad de reparación del ovocito es ocasionalmente afectado por otros factores como la edad materna entre muchos otros. Bajo estas condiciones, el daño al ADN puede superar la capacidad de reparación, creando mutaciones severas. El ovocito puede reparar daños a una sola hebra del ADN, pero si el daño es importante en ambas hebras, el ovocito, al tratar de corregir estas fallas, produce errores genéticos que afectan severamente el desarrollo de los embriones.<sup>(38)</sup> Algunos autores han demostrado que la fragmentación del ADN no afecta el índice de fertilización pero si afecta el desarrollo embrionario pre y post implantación. Se ha encontrado una relación entre el porcentaje de fragmentación del

ADN espermático y el índice de fertilización, observada tanto en análisis para FIV e ICSI, sin encontrar diferencia entre estas dos técnicas.<sup>18)</sup> Otros autores encontraron una correlación negativa entre la fragmentación del ADN espermático y el desarrollo del blastocisto después de FIV o ICSI.<sup>(23)</sup> Velez y colaboradores<sup>(18)</sup>, observaron que existe una correlación entre el índice de fertilización y el índice de fragmentación del ADN espermático, solo cuando el porcentaje de fragmentación fue menor de 18% (por método SCSA), siendo entonces un predictor significativo de la fertilización del ovocito. No observaron una relación directa entre la fragmentación del ADN espermático y la tasa de embarazo clínico o el número de nacimientos.<sup>(18)</sup> A pesar de los múltiples avances en las técnicas de fertilización in vitro, uno de los mayores intereses en las mismas, son las barreras naturales para la fertilización por espermatozoides defectuosos que provocan causas genéticas de infertilidad y otras alteraciones a la salud de la descendencia.<sup>(7, 28)</sup> Muchos reportes recientes de ICSI describen malformaciones fetales y una asociación con limitaciones en las pruebas genéticas pre implantación en muchas parejas infértiles con factor masculino.<sup>(7)</sup>

#### **4. 13. Papel de los antioxidantes como tratamiento preventivo de la fragmentación del ADN espermático**

Los antioxidantes en general, son eliminadores de los radicales libres que suprimen la formación de ROS o se oponen a su acción. Superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa, se conocen bien como antioxidantes biológicos que convierten los radicales del superóxido y peróxido a formas de oxígeno y agua.<sup>(7)</sup>

El daño oxidativo espermático, teóricamente puede ser prevenido con el uso de antioxidantes y suplementos dietéticos. Algunos protocolos de estimulación en laboratorios de reproducción asistida usan agentes químicos, por ejemplo, la pentoxifilina, factor activador plaquetario, cafeína, 2 deoxiadenosina, L – carnitina y acetil carnitina, los cuales se ha observado, mejoran los resultados de estos procedimientos.<sup>(7)</sup> Azzi y colaboradores realizaron un estudio donde se administró tratamiento antioxidante de vitamina C (1 gramo) y vitamina E (1 gramo) diariamente durante 2 meses previos al tratamiento con inyección espermática intracitoplasmática (ICSI). Después del tratamiento se observaron niveles significativamente menores de daño al ADN espermático concomitante con mejores resultados durante el procedimiento de ICSI.<sup>(41, 42)</sup>

Paradójicamente, en algunas pruebas, la adición de las combinaciones de antioxidantes tales como vitamina C y E, se ha observado que puede tener efectos dañinos sobre el ADN en pruebas in vitro e in vivo, causando descondensación del ADN.<sup>(5)</sup>

La mayoría de los laboratorios utilizan varios aditivos, estimulantes espermáticos y procedimientos enriquecedores para los espermatozoides que pueden ayudar a la recuperación de los espermatozoides funcionales y lograr la fertilización. El uso generalizado de muchos antioxidantes ha abierto un debate sobre si es verdad que estos pueden provocar cambios que mejoren la fertilización por una protección al daño inducido por los radicales libres y el estrés oxidativo.<sup>(7)</sup>

Dentro de la categoría de antioxidantes químicos se incluyen tanto productos naturales como sintéticos, su uso en reproducción y manejo de la infertilidad no ha sido completamente demostrado. Es posible que la pentoxifilina, un conocido estimulador de la motilidad espermática, pueda actuar además como supresor de los ROS y mejorar las

condiciones espermáticas. También el papel de la vitamina E y C, los cuales actúan protegiendo a los espermatozoides de los radicales peroxil y alcoxil. Existen otros factores protectores como los carotenoides. Debido a que la generación de ROS es la mayor fuente de daño al espermatozoide, los antioxidantes pueden jugar un papel importante en la apoptosis durante la espermatogénesis, su almacenamiento y tránsito a través del tracto genital. Esto tiene además efecto protector contra infecciones y por lo tanto mejorar la calidad espermática reduciendo el daño al ADN.<sup>(7)</sup>

Se cree que para los hombres con infertilidad idiopática, la suplementación dietaria con una combinación de vitamínicos bien tolerados, clínicamente eficientes y no invasivos, tales como la L – carnitina, acetilcarnitina, vitamina E, vitamina C, fructosa, ácido cítrico, selenio y zinc, que proveen una terapia farmacológica alternativa para mejorar la calidad espermática y la probabilidad de éxito de los procedimientos de reproducción asistida. La administración de antioxidantes a los pacientes que serán sometidos a procedimientos de reproducción asistida, puede enriquecer el esperma eyaculado.<sup>(3, 7, 43)</sup>

No está bien claro cómo alguno de estos antioxidantes tienen el mismo efecto cuando se combinan, sin embargo, el consumo excesivo de algunos antioxidantes especialmente en combinación, pueden causar otros efectos secundarios deletéreos y su uso debe ser monitorizado cuidadosamente.<sup>(7, 44)</sup>

## **V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Se correlaciona el nivel de fragmentación del ADN espermático con los parámetros del análisis seminal convencional y con los factores ambientales de riesgo?



## **VI. OBJETIVO**

Determinar el porcentaje de fragmentación del ADN espermático en pacientes que acudieron a la clínica por infertilidad masculina, analizando los diversos factores de riesgo y su relación con los parámetros de análisis seminal convencional.

## **VII. HIPÓTESIS**

Existen múltiples causas de infertilidad masculina que pueden diagnosticarse por el análisis convencional de la muestra seminal, sin embargo, en los casos de infertilidad masculina inexplicable o idiopática, deben realizarse pruebas de la integridad del material genético del espermatozoide, el cual al presentar datos de fragmentación del ADN o la cromatina, explican muchos de los casos de infertilidad masculina. Los pacientes que cursan con algunas entidades clínicas (obesidad, varicocele, cáncer testicular) y que están expuestos a diversos factores de riesgo (tabaquismo, alcoholismo, sedentarismo, exposición ambiental a tóxicos y termogénicos), asociado con los parámetros anormales en la espermatobioscopía directa, presentan un porcentaje mayor de fragmentación del ADN espermático.

## VIII. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la infertilidad representa un problema clínico serio y cada vez más frecuente, siendo el factor masculino la causa hasta en un 50% de los casos. <sup>(3,4)</sup> La infertilidad masculina está sub – diagnosticada, ya que los parámetros del análisis seminal convencional proporcionan sólo información básica y no es concluyente en aquellos casos de pacientes con infertilidad inexplicable o idiopática. El éxito de las técnicas de reproducción asistida radica en la integridad estructural y funcional de los gametos, y aunque en estas técnicas se seleccionan los gametos con mejores patrones funcionales, no aportan mayores datos sobre la calidad de la información genética que contienen, sobre todo si la técnica a realizarse es una Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). Se han desarrollado múltiples técnicas para el análisis del material genético del espermatozoide. Se ha demostrado que la fragmentación del ADN espermático es una causa de alteraciones funcionales, provocando infertilidad masculina y/o defectos del desarrollo embrionario, disminuyendo significativamente la posibilidad de lograr un embarazo, ya sea de manera espontáneo o más aún, en parejas sometidas a técnicas de reproducción asistida. <sup>(6, 7, 9)</sup> La importancia de entender los mecanismos de apoptosis de las células germinales es evidente, resaltando la necesidad de nuevas modalidades de diagnóstico y tratamiento para la infertilidad masculina. <sup>(10)</sup>

## IX. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio clínico, observacional descriptivo, cuya población consta de 30 pacientes que acudieron a la clínica de reproducción y genética por presentar infertilidad masculina. Esta es la primera parte de un estudio prospectivo que abarca un total de 75 pacientes evaluados de enero de 2007 a diciembre de 2008, reclutándose a la fecha pacientes sanos donadores de semen para formar el grupo control.

Se evaluaron los siguientes parámetros: edad, infertilidad primaria y secundaria, años de evolución de la infertilidad, índice de masa corporal, antecedente de toxicomanías (tabaquismo, alcoholismo, drogadicción), exposición ambiental a tóxicos (radiación, solventes, quimioterapia, metales, termogénicos), hábito de actividad física, tratamiento con antioxidante, antecedentes médicos, quirúrgicos o traumáticos sobre el área genital, datos de patología testicular a la exploración física, además de diversos parámetros de la espermotobioscopía directa tales como volumen, densidad, motilidad por grado de progresión, morfología, total de formas espermáticas funcionales y capacitación de la muestra.

Se realizó espermotobioscopía directa en los 30 pacientes obteniendo la muestra de manera habitual con 3 a 5 días de abstinencia sexual. Se formaron dos grupos, el primero, los pacientes cuya muestra fueron sometidas a capacitación espermática y el segundo, pacientes cuya muestra no fue sometida a capacitación espermática, analizando en ambos grupos los parámetros convencionales del examen seminal

Todas las muestras, posterior al examen seminal, se les sometió al análisis COMETA. Las muestras fueron inmersas entre dos capas de agarosa sobre una laminilla de microscopio para posteriormente, someterlas a una lisis alcalina. Posteriormente se renueva la solución de lisis y se enriquece con proteinasa K, para lisar por completo las membranas y la envoltura nuclear. Los siguientes pasos implican una incubación de alta alcalinidad para desdoblar el ADN y una electroforesis bajo las mismas condiciones que permitirá resolver fragmentos de ADN de  $1 \times 10^{10}$  dalton de ADN.

De los resultados obtenidos de la fragmentación del ADN, se revisaron diferentes parámetros: viabilidad de las células analizadas, células vivas, fragmentación media del ADN en la cabeza espermática, fragmentación media del ADN en la cola espermática, fragmentación media del ADN en la intensidad de la longitud de la cola (Olive Tail Moment) y la media de la migración del ADN espermático, considerando además desviación estándar y rango de error de los parámetros mencionados.

La evaluación de los resultados se efectuó utilizando la prueba de chi cuadrada ( $X^2$ ) para variables independientes nominales, considerando un valor de  $P < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## X. RESULTADOS

Se analizaron las muestras seminales de 30 pacientes que acudieron a la clínica de reproducción y genética por presentar infertilidad masculina.

Del primer grupo, 17 muestras capacitadas, la media de edad fue de 42 años, +/- 12 (rango 30 a 54); del segundo grupo, 13 muestras no capacitadas, la media de edad fue 38.5 años, +/- 9.5 (29 a 48).

Del primer grupo, 14 pacientes (82.35%), presentaron infertilidad primaria y 3 (17.64%) presentaron infertilidad secundaria. En el segundo grupo, 10 pacientes (76.92%) presentaron infertilidad primaria y 3 (23.08%) presentaron infertilidad secundaria. Tabla 2.

**Tabla 2. Infertilidad primaria o secundaria en ambos grupos.**

<b>Variable/Grupo</b>	<b>I. Primaria</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>I. Secundaria</b>	<b>Porcentaje</b>
Primer grupo	14	82.35%	3	17.64%
Segundo grupo	10	76.92%	3	23.08%

La media en años de infertilidad fue de 4.5 años +/- 3.5 (rango 1 a 8) en el primer grupo, y de 6 años +/- 5 (rango 1 a 11) en el segundo grupo de pacientes.

En el índice de masa corporal, la media para el primer grupo fue de 27 +/- 3 (rango 24 a 30), mientras que para el segundo grupo la media fue de 26.5 +/- 3.5 (rango 23 a 30). Tabla 3.

**Tabla 3. Índice de masa corporal por grupo**

<b>Grupo</b>	<b>IMC (media)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Rango</b>
Primer grupo	27	3	24 a 30
Segundo grupo	26.5	3.5	23 a 30

Se registró antecedente de hábito tabáquico en 4 pacientes (23.52%) del primer grupo y en 4 pacientes (30.76%) del segundo grupo.

Del primer grupo, 13 pacientes (76.48%) refirieron antecedente de alcoholismo social, mientras que en el segundo grupo 11 pacientes (84.62%) refirieron dicho antecedente.

La exposición a tóxicos ambientales (solventes, radiación, metales pesados) sólo fue positiva en 1 paciente (5.88%) del primer grupo y en sólo 2 pacientes (15.38%) del segundo grupo.

La exposición a termogénicos laborales o ambientales (calderas, sauna, jacuzzi), se registró en 5 pacientes (29.42%) del primer grupo y en 1 paciente (7.69%) del segundo grupo. Predominó el sedentarismo en ambos grupos, 13 pacientes (76.48%) del primer grupo y 9 pacientes (69.24%) en el segundo.

Sólo 1 paciente (5.88%) del primer grupo recibió tratamiento antioxidante con vitamina C, y 3 pacientes (23.07%) en el segundo grupo. Por exploración física, se encontró varicocele en 3 pacientes (17.64%) del primer grupo y en 2 (15.38%) del segundo. Tabla 4.

**Tabla 4. Factores ambientales de riesgo asociados a cada grupo.**

<b>Variable</b>	<b>Primer grupo</b>	<b>Segundo grupo</b>
Tabaquismo	4 (23.52%)	4 (30.76%)
Alcoholismo	13 (76.48%)	11 (84.62%)
Tóxicos ambientales o laborales	1 (5.88%)	2 (15.38%)
Termogénicos	5 (29.42%)	1 (7.69%)
Sedentarismo	13 (76.48%)	9 (69.24%)
Varicocele	3 (17.4%)	2 (15.38%)
Uso de antioxidantes	1 (5.88%)	3 (23.07%)

Se realizó análisis seminal por espermatobioscopía directa en ambos grupos, encontrando una media del volumen de 1.65 ml +/- 1.35 ml (rango 0.3 a 3ml) en el primer grupo, mientras que en el segundo se registró una media de 2.25 ml +/- 1.75 ml (rango 0.5 a 4 ml). El grado de progresión lenta (1+, 2+) se registró en 6 pacientes (35.30%) del primer grupo y en 10 pacientes (76.93%) del segundo grupo; la progresión rápida (3+, 4+) se registró en 11 pacientes (64.70%) en el primer grupo y en 3 pacientes (23.07%) del segundo grupo.

La morfología anormal predominó en ambos grupos, registrándose una media de formas anormales de 90.5% +/- 6.5 (rango 84 a 97%) en el primer grupo y una media de formas anormales de 92.5% +/- 6.5 (rango 86 a 99%) en el segundo grupo.

La densidad espermática de las muestras mostró una media de  $22.5 \times 10^6$  +/- 21.5 (rango 1 a  $44 \times 10^6$ ) en el primer grupo, y una media de  $58 \times 10^6$  +/- 54 (rango 4 a  $112 \times 10^6$ ) en el segundo grupo.

La media de espermatozoides móviles (TMFS) en el primer grupo fue de  $28.05 \times 10^6$  +/- 27.95 (rango 0.1 a 56) y de  $42.5 \times 10^6$  +/- 42.49 (rango 0.01 a  $85 \times 10^6$ ) en el segundo grupo. Según los criterios morfológicos estrictos de Kruger, ninguno de los pacientes del primer grupo obtuvo una calificación mayor de 4, y en el segundo grupo, solo 1 paciente (7.7%) tuvo una calificación arriba de 4. Tabla 5.

**Tabla 5. Análisis seminal en ambos grupos**

	<b>Muestras capacitadas</b>	<b>Muestras no capacitadas</b>
<b>Volumen (ml)</b>		
<b>Media</b>	1.65	2.25
<b>minimo</b>	0.3	0.5
<b>Maximo</b>	3	4
<b>desviación estándar</b>	1.35	1.75
<b>Morfología (%)</b>		
<b>Media</b>	90.5	92.5
<b>minimo</b>	84	86
<b>Maximo</b>	97	99
<b>desviación estándar</b>	6.5	6.5
<b>Densidad (mill / ml)</b>		
<b>Media</b>	22.5	58
<b>minimo</b>	1	4
<b>Maximo</b>	44	112
<b>desviación estándar</b>	21.5	42.49
<b>TMFS (mill / ml)</b>		
<b>Media</b>	28.05	42.5
<b>minimo</b>	0.1	0.01
<b>Maximo</b>	56	85
<b>desviación estándar</b>	27.95	42.49
<b>Progresión</b>		
<b>1 +, 2+</b>	6 (35.30%)	10 (76.93%)
<b>3+, 4+</b>	11 (64.70%)	3 (23.07%)
<b>Kruger</b>		
<b>&lt; 4</b>	17 (100%)	12 (92.3%)
<b>&gt; 4</b>	0	1 (7.7%)

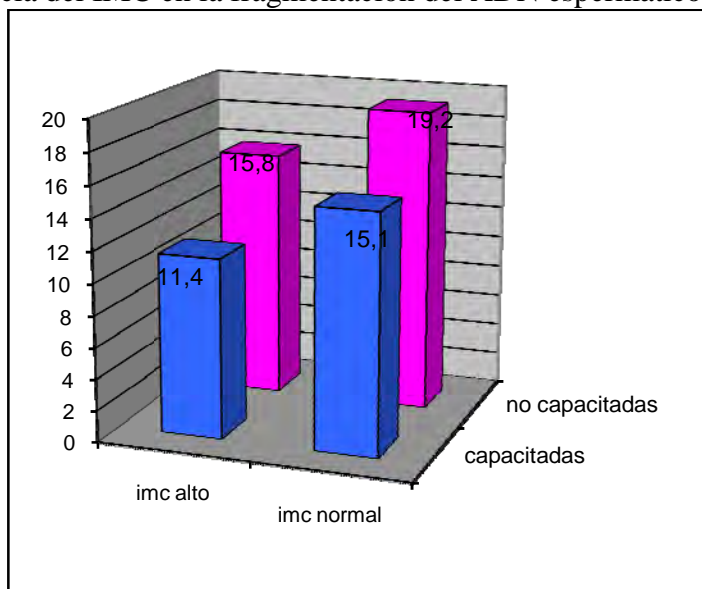
En el análisis del estudio COMETA, en las muestras obtenidas se encontró viabilidad del 100% de las células estudiadas, con una media de 85.02 +/- 84.97 de células vivas, (rango 0.045 a 170). La media de fragmentación del ADN registrada en la intensidad de la cola del cometa (olive tail moment) fue del 11.4% +/- 6.9 (rango 4.5 a 18.3%) para el primer grupo y del 15.8% +/- 9.1 (rango 6.7 a 24.9%) para el segundo grupo. Respecto a la influencia de los factores ambientales sobre la fragmentación del ADN, se analizó por factor de riesgo, encontrando un mayor porcentaje de fragmentación en las muestras no capacitadas con índice de masa corporal normal (19.2%), en muestras no capacitadas sin antecedente de hábito tabáquico (17.5%), en muestras no capacitadas con antecedente de alcoholismo (15.8%), en muestras no capacitadas expuestas a tóxicos ambientales (17.15%), en muestras no capacitadas expuestas a terrogénicos laborales o ambientales (21.1%), en muestras no capacitadas de pacientes sedentarios (15.8%), en muestras no capacitadas de pacientes que recibieron tratamiento antioxidante (15.8%), y en muestras no capacitadas de pacientes con varicocele (16.05%). Los valores de la media de cada grupo con su análisis estadístico, se muestra en la tabla 6 y sus gráficas respectivas (1- 8)

**Tabla 6. Influencia de los factores de riesgo en la fragmentación del ADN espermático.**

	<b>Muestras capacitadas (porcentaje/media)</b>	<b>Muestras no capacitadas (porcentaje/media)</b>	<b>P</b>
<b>imc alto</b>	11.4	15.8	0.02
<b>imc normal</b>	15.1	<b>19.2</b>	
<b>tabaquismo</b>	12.05	15.8	0.05 (NS)
<b>no tabaquismo</b>	11.4	<b>17.5</b>	
<b>alcoholismo</b>	11.4	<b>15.8</b>	0.08 (NS)
<b>no alcoholismo</b>	13	14.35	
<b>toxicos</b>	13.7	<b>17.15</b>	0.02
<b>no toxicos</b>	11.7	15.8	
<b>termogénicos</b>	10.75	<b>21.1</b>	0.15 (NS)
<b>no termogénicos</b>	12.8	15.8	
<b>actividad física</b>	10.35	13.6	0.02
<b>Sedentarismo</b>	11.4	<b>15.8</b>	
<b>Antioxidante</b>	13.4	<b>15.8</b>	0.04
<b>no antioxidante</b>	11.4	15.5	
<b>Varicocele</b>	15.25	<b>16.05</b>	0.09 (NS)
<b>no varicocele</b>	11.4	15.8	

NS: estadísticamente no significativo

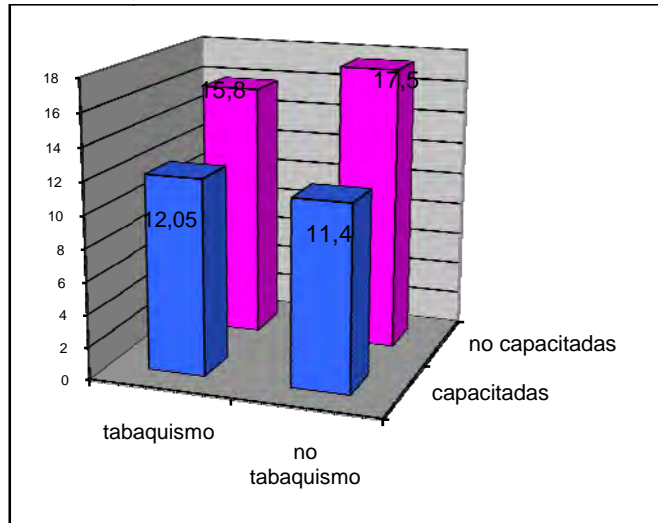
**Gráfica 1. Influencia del IMC en la fragmentación del ADN espermático**



El índice de masa corporal se observó más elevado en el segundo grupo

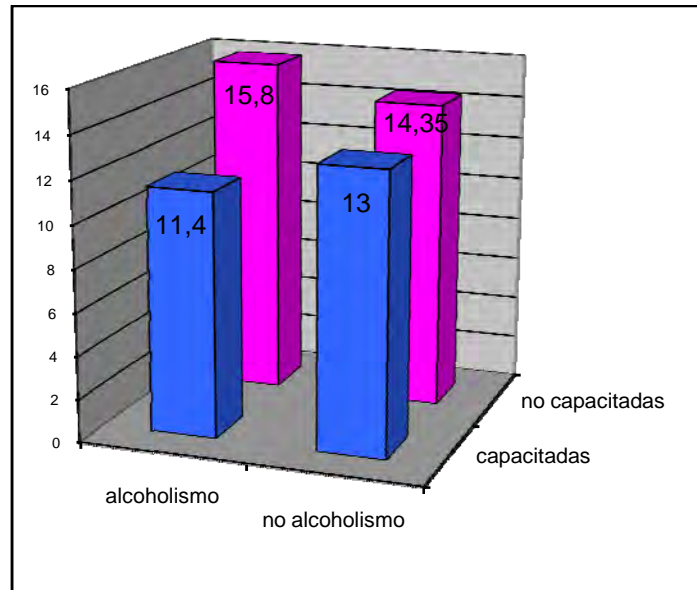


Gráfica 2. Influencia del tabaquismo en la fragmentación del ADN espermático



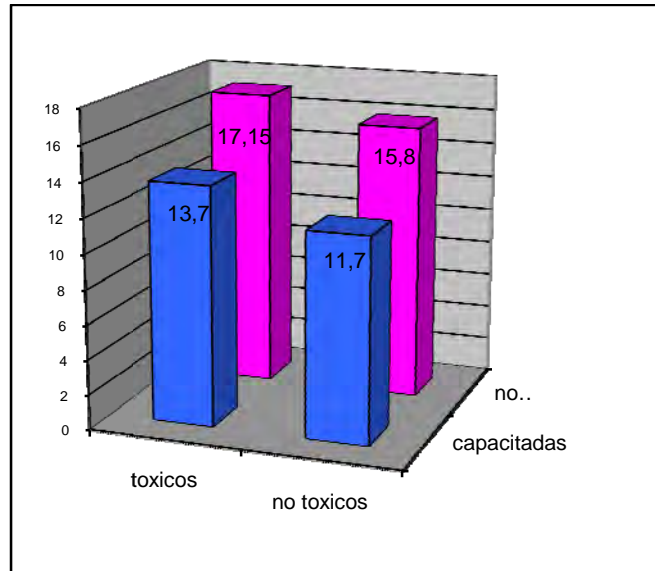
El porcentaje promedio de fragmentación fue mayor en el segundo grupo, en pacientes sin hábito tabáquico

Grafica 3. Influencia del alcoholismo en la fragmentación del ADN espermático.



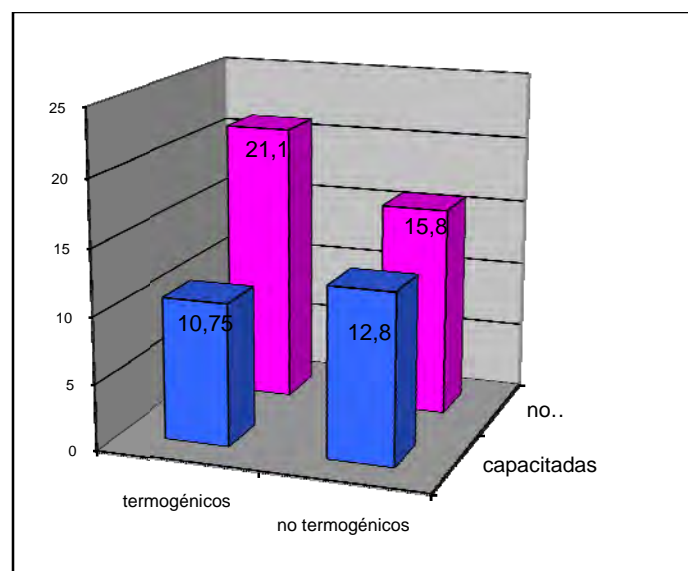
El porcentaje promedio de fragmentación fue mayor en el segundo grupo, con antecedente de alcoholismo

Gráfica 4. Influencia de la exposición a tóxicos ambientales en la fragmentación del ADN espermático.



El porcentaje promedio de fragmentación fue mayor en el segundo grupo, en pacientes expuestos a tóxicos

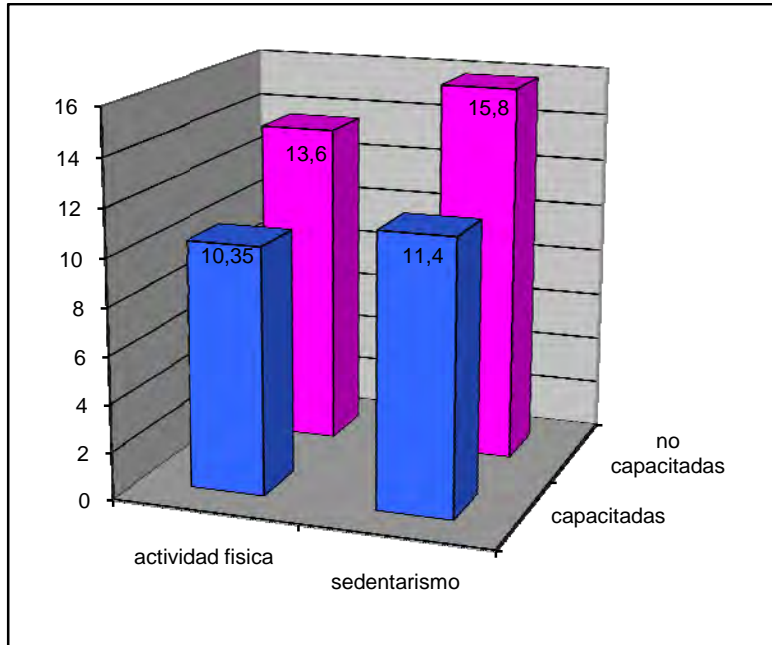
Gráfica 5. Influencia de la exposición a termogénicos en la fragmentación del ADN espermático.



El porcentaje promedio de fragmentación fue mayor en el segundo grupo,

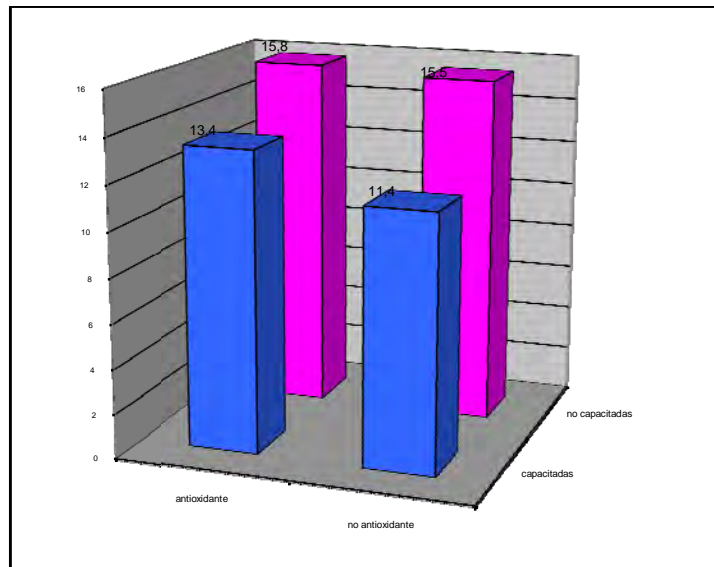
en pacientes expuestos a termogénicos

Gráfica 6. Influencia del sedentarismo en la fragmentación del ADN espermático.



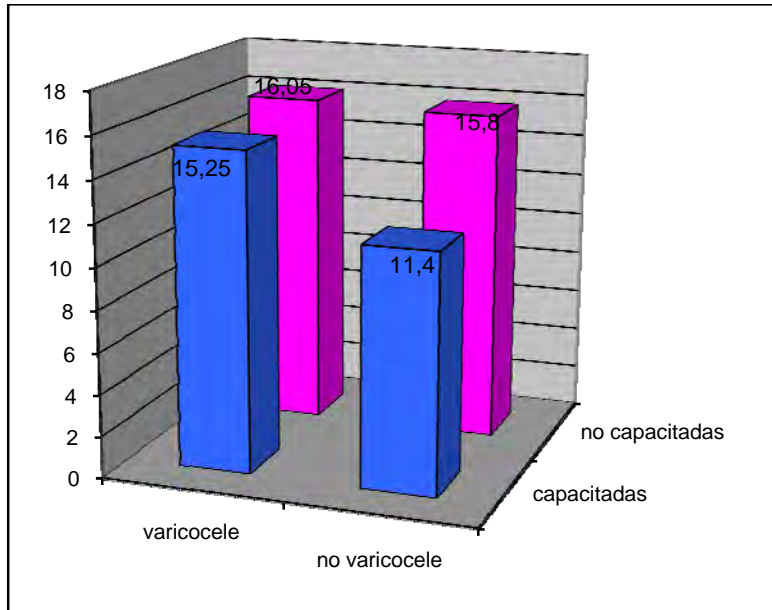
El porcentaje promedio de fragmentación fue mayor en el segundo grupo, en pacientes sedentarios

Gráfica 7. Influencia del tratamiento antioxidante en la fragmentación del ADN espermático.



El porcentaje promedio de fragmentación se observó en el segundo grupo, en pacientes que recibieron tratamiento antioxidante

Gráfica 8. Influencia del varicocele en la fragmentación del ADN espermático.



El porcentaje promedio de fragmentación fue mayor en el segundo grupo, en pacientes con varicocele

## XI. DISCUSIÓN.

En décadas actuales se han hecho progresos sustanciales en el entendimiento de los mecanismos de fertilización, permitiendo reconocer el papel clave que tiene la integridad del genoma espermático.<sup>(18)</sup> En comparación con otras células, el ADN espermático es, de manera normal, altamente resistente a la desnaturalización física o química; las alteraciones del empacamiento de la cromatina en los espermatozoides humanos pueden dar lugar a defectos en la arquitectura nuclear espermática, tales como deficiencia de histonas o su reemplazo por protaminas durante la espermatogénesis en algunos pacientes.<sup>(36)</sup> Estas anomalías aumentan la sensibilidad y la inestabilidad del ADN al daño por el estrés oxidativo, con la subsecuente generación de especies reactivas al oxígeno, las cuales juegan un papel importante en el daño al ADN de las células germinales como también se ha establecido en la fragmentación del ADN de las células somáticas.<sup>(36)</sup> Se ha demostrado que la fragmentación del ADN espermático puede estar asociada con la pérdida del factor activador del ovocito. No se ha encontrado un incremento significativo en la fragmentación del ADN espermático en relación a la edad, sin embargo, si hay una tendencia mayor de daño en los hombres mayores.<sup>(36)</sup> El umbral clínico no ha sido establecido para el ensayo COMET alcalino o neutro, sin embargo, en diversos estudios, se ha comprobado que el estudio COMET tiene mayor sensibilidad en medir el daño al ADN que algunos otros, lo cual puede ser de gran utilidad en pacientes infértiles sometidos a técnicas de reproducción asistida. El ensayo alcalino COMET permite valorar la ruptura de las hebras del ADN y los sitios lábiles a la alcalinidad. Esto se ha probado in vitro e in vivo en una variedad de células de mamíferos empleando un número diverso de estimulantes genotóxicos incluyendo radiaciones ultravioleta, carcinógenos, radioterapia y quimioterapia. Ha mostrado ser un procedimiento rápido, de fácil reproducción y tienen una alta sensibilidad.<sup>(2)</sup>

Según los datos encontrados en este estudio, el 96.67% de las muestras mostraron niveles elevados de fragmentación del ADN espermático, comparando con lo descrito en la literatura, considerándose normal hasta un 5% de fragmentación

Sólo algunos de los factores de riesgo pudieron demostrar su influencia al reflejar un porcentaje discretamente mayor de fragmentación del ADN espermático, tal fue el caso de aquellos pacientes con antecedente de alcoholismo, exposición a tóxicos ambientales y termogénicos, pacientes con hábito de sedentarismo y pacientes que clínicamente presentan varicocele. Los factores que no demostraron estadísticamente su influencia, sin embargo, se describen como factores importantes en la literatura, requiriendo entonces, ampliar este estudio con una muestra de pacientes que permita un adecuado análisis estadístico.

Sergerie y colaboradores, no encontraron una diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de fragmentación del ADN espermático en pacientes fumadores (12.11%) en comparación con el porcentaje registrado en pacientes no fumadores (11.66%), por lo que no se puede establecer una relación directa del consumo tabáquico y la fragmentación del ADN espermático<sup>(45)</sup>.

Saleh y colaboradores encontraron que la fragmentación del ADN espermático está significativamente incrementada en varones con infertilidad y varicocele en comparación con varones normales a la exploración genital.<sup>(8)</sup> Aunque algunos autores no han encontrado diferencias significativas en la frecuencia de células espermáticas con fragmentación del ADN entre grupos con varicocele y un grupo con sólo infertilidad.<sup>(30)</sup>

A pesar de que diversos estudios mencionan a los procedimientos de preparación espermática como un factor de riesgo para aumentar la fragmentación del ADN espermático <sup>(2, 10, 21)</sup>, en este estudio observamos los niveles más altos de fragmentación en aquellas muestras que no fueron sometidas a capacitación espermática tanto al análisis seminal convencional nivel general como en el análisis de la fragmentación del ADN espermático, aunado a los diversos factores de riesgo.

En nuestro estudio, estadísticamente no se refleja una influencia directa y contundente de los factores de riesgo, sin embargo, se demuestran altos niveles de fragmentación del ADN espermático en los pacientes, cuyos resultados se correlacionan directamente con la calidad de la muestra seminal analizada de manera convencional por espermatobioscopía directa.

El uso de antioxidantes como medida terapéutica es controvertido, Greco y colaboradores realizaron un estudio con hombres infértiles no fumadores con altos niveles de fragmentación del ADN espermático. Demostraron una reducción importante en la incidencia de la fragmentación del ADN en espermatozoides eyaculados después de dos meses de tratamiento con antioxidante oral, sin embargo, no hubo mejoría en la concentración espermática, la motilidad o la morfología después del tratamiento. Suleiman y colaboradores demostraron mejoría en la concentración espermática y la motilidad después de seis meses de tratamiento con sólo vitamina E. Sin embargo, estos estudios no mostraron mejoría de los parámetros mencionados en aquellos pacientes que presentaban algún otro factor de riesgo o condición médica causal de fragmentación del ADN espermático, por lo que no se ha establecido como un estándar de tratamiento. <sup>(46)</sup>

Se ha demostrado que tanto la fragmentación del ADN espermática reflejada en la cabeza y la cola del cometa, están correlacionados significativamente con los resultados de los procedimientos de fertilización in vitro, aunque pueden fallar para establecer un pronóstico de embarazo. La intensidad de la cabeza y la longitud de la cola pueden ser útiles para predecir la probabilidad de embarazo o falla del mismo. <sup>(35)</sup>

## XII. CONCLUSIONES

La infertilidad masculina es causada por múltiples circunstancias las cuales se han descrito a lo largo de este estudio. A pesar de la revisión clínica y el análisis seminal convencional, establecer el factor causal ha sido un reto para los especialistas en las técnicas de reproducción asistida, tendiendo que intervenir de manera ínter multidisciplinaria, por mencionar biólogos de la reproducción, genetistas, urólogos, endocrinólogos, embriólogos, etc. La intervención de estas especialidades médicas ha facilitado el desarrollo de nuevas técnicas para analizar la integridad de la información genética del espermatozoide, lo cual, como se ha demostrado, es parte esencial para un adecuado potencial de fertilidad del mismo.

La evidencia de la literatura demuestra que el daño al ADN espermático, afecta el resultado de la fertilidad de tal forma que, una muestra seminal que presente una alta frecuencia de espermatozoides con ADN fragmentado, tendrá mayor dificultad para producir un embarazo, en comparación con una muestra seminal con bajos niveles de fragmentación.

El ensayo COMETA es un análisis útil en el estudio de la fragmentación del ADN espermático que nos muestra que, a pesar de parámetros seminales convencionales relativamente normales, y más aún, en parámetros severamente anormales, se pueden detectar niveles altos de fragmentación del ADN espermático, para establecer un pronóstico de la capacidad fértil de los pacientes afectados.

El ensayo COMETA puede detectar daño equivalente desde tan pequeñas como la ruptura de 50 hebras únicas por célula. Otra característica importante de este ensayo es su habilidad para caracterizar la respuesta en una población celular heterogénea por la medición del daño al ADN en células individuales a diferencia de otros estudios que solo miden el grueso de células dañadas comparando con células sin daño.<sup>(5)</sup> El estudio Cometa solo requiere 100 células por análisis, lo cual es particularmente útil para estudios que involucran el análisis del ADN de espermatozoides obtenidos por biopsia testicular y en muestras de pacientes con una muy baja concentración espermática en el eyaculado.<sup>(5)</sup>

Múltiples factores de riesgo, clínicos y ambientales, intervienen alterando el equilibrio que normalmente existe en el testículo para la protección de los espermatozoides durante su formación y maduración, provocando daño al ADN, lo que conlleva un desarrollo deficiente del mismo lo cual repercute directamente a la calidad espermática, la calidad embrionaria y la posibilidad de embarazo.

Existen algunas recomendaciones terapéuticas para disminuir el nivel de estrés oxidativo, tales como suspensión de toxicomanías como tabaquismo y alcoholismo, minimizar la exposición laboral a altas temperaturas, toxinas y contaminantes, prescribir tratamiento antibiótico si se comprueba infección, cirugía si hay datos de varicocele, biopsia testicular para obtener espermatozoides testiculares para realizar ICSI en pacientes con altos porcentajes de fragmentación del ADN, prescripción de antioxidantes con o sin anti - inflamatorio para disminuir la concentración de leucocitos a nivel seminal y, en su caso, disminuir el daño provocado por los procedimientos de preparación seminal como el centrifugado o la criopreservación.

Como previamente se ha descrito, ninguno de estos tratamientos ha mostrado un 100% de efectividad, sin embargo, al disminuir las condiciones agravantes del proceso de oxidación que, fisiológicamente sufre el espermatozoide durante su maduración, se disminuye sustancialmente el riesgo de mayor daño al material genético y por lo tanto, se puede ofrecer mejores condiciones espermáticas para procedimientos de reproducción asistida.

Para los médicos y científicos que trabajan en el campo de la reproducción asistida existen dos retos: el primero es establecer pruebas para una adecuada evaluación del ADN espermático, con alto valor pronóstico; el segundo es persuadir a los clínicos y directivos de los centros de fertilidad de la inducción de estas pruebas en el estudio de la infertilidad masculina, lo cual beneficiará tanto al paciente como a los mismos centros de reproducción. En la actualidad no existe un consenso de cuál es la mejor prueba de análisis del ADN espermático, existen muchas tendencias, por lo que se requerirá de la colaboración internacional para estandarizar protocolos, grupos de pacientes y el desarrollo de nuevas técnicas que permitan realizar el análisis del ADN espermático en la mayoría de los laboratorios de Andrología.



### **XIII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Irving S., Twigg J., Gordon E. et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *Journal of Andrology* 2000; 21; 1; 33-45.
2. Evenson D, Larson K, Jost L. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* 2002; 23; 1; 25 – 43.
3. Greco E., Scarselli F., Iacobelli M. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human Reproduction* 2005; 20; 1; 226 – 230.
4. Garcia B., Fariello R., Restelli A. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertility and Sterility* 2008; 90; 1716 – 22.
5. Lewis S., Agbaje I. Using the alkaline comet assay in prognostic test for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis* 2008; 23; 3; 163 – 170.
6. Michelucci R., Pimenta B., Montagnini S. Sperm nuclear apoptotic DNA fragmentation in men with testicular cancer. *Fertility and Sterility* 2008; 90; 5; 1782 – 86.
7. Sikka Suresh C. Role of oxidative stress and antioxidant in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*; 2004; 25; 1; 165 - 186
8. Werthman P., Wixon R., Kasperson K. Significant decrease in sperm deoxyribonucleic acid fragmentation after varicocelectomy. *Fertility and Sterility* 2008; 90; 1800 – 4.
9. Tesarik J., Greco E., Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction* 2004; 19; 3; 611 – 615
10. Said T., Paasch U., Glander HJ et al. Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction Update* 2004; 10; 1; 39 – 51.
11. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm – cervical mucus interaction. *Ann Inst Super Sanita* 2001; 37 (1); I – XII, 1 – 23.
12. Dohle G., Jungqirth A., Colpi G. et al. Guidelines on male infertility. *European Association of Urology*. 2008. pp 6 – 12.
13. Tremellen Kelton. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Human Reproduction Update*. 2008; 14 (3); 243 – 258.
14. Zini A., Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 2006; 175 (5); 495 – 500.
15. Fernandez JL., Muriel L., Rivero MT et al. The Sperm chromatin dispersión test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology* 2003; 24; 1; 59- 66.

16. Pérez Peña E. Atención integral de la infertilidad. 2ª edición. Ed. Mc Graw – Hill, 2007, pp 465 – 475.
17. Shefi S., Turek P. Definition and current evaluation of subfertile men. *International Brazilian Journal of Urology*. 2006; 32; 4; 385 – 97.
18. Velez de la Calle J., Muller A., Walschaerts M. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertility and Sterility* 2008; 90; 1792 – 9.
19. Neal M., Hughes E., Holloway C et al. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Human Reproduction* 2005; 20 (9); 2531 – 2535.
20. Agarwal A, Said T. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update* 2003; 9 (4); 331 – 345.
21. Edelstein A., Yavetz H., Kleiman S. Effect of long term storage on deoxyribonucleic acid damage and motility of sperm bank donor specimens. *Fertility and Sterility* 2008; 90;4; 25 - 34.
22. Yildiz C., Ottaviani P., Law N. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction* 2007; 133; 585 – 595.
23. Lachaud C., Tesarik J., Cañadas M et al. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Human Reproduction* 2004; 19 (3); 607 – 610.
24. Marchetti C., Obert G., Deffosez A et al. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction* 2002; 17 (5); 1257 – 1265.
25. Twigg J., Fulton N., Gomez E et al. 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. *Human Reproduction* 1998; 13 (6) 1429 – 1436.
26. Loft S., Kold – Jensen T., Hjollund N et al. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Human Reproduction* 2003; 18 (6); 1265 – 1272.
27. Muratori M., Marchaini S., Tamburrino L. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *Human Reproduction* 2008; 23 (5); 1035 – 1043.
28. Meseguer M., Santiso R., Garrido N. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertility and Sterility* 2008; 20; 1 – 8.
29. Tesarik J., Ubaldi F., Rienzi L. Caspase – dependent and independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis. *Human Reproduction* 2004; 19; 2; 254 – 61
30. Enciso M, Muriel L, Fernandez JL et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level,

- evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *Journal of Andrology* 2006; 27; 1; 106- 111.
31. Grigaravicius P, Rapp A, Greulich K. A direct view by immunofluorescent COMET assay (IFCA) of DNA damage induced by nicking and cutting enzymes, ionizing 137 CS radiation, UV – A laser microbeam irradiation and radiomimetic drug bleomycin. *Mutagenesis* 2009; 24; 2; 191 – 197.
  32. Morales R. LA. Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*; 2007; 24; 5 - 8.
  33. Muratori M., Piomboni P., Baldi E et al. Functional and ultrastructural features of DNA fragmented human sperm. *Journal of Andrology* 200; 21 (6); 903 – 912.
  34. De la Torre J., Lopez Fernandez C., Pita M et al. Simultaneous observation of DNA fragmentation and protein loss in the boar spermatozoon following application of the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test. *Journal of Andrology* 2007; 28 (4); 533 – 540
  35. Tomsu M., Sharma V., Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Human Reproduction* 2002; 17 (7); 1856 – 1862.
  36. Lopes S., Jurisicova A., Casper R. Gamete – specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1998; 13; 3; 703 – 708.
  37. Ricci G., Perticarari S., Fragonas E et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human Reproduction* 2002; 17 (10); 2665 – 2672.
  38. Pérez – Crespo M., Moreira P, Pintado B. et al. Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice. *Journal of Andrology* 2008; 29; 1; 62- 68
  39. Marchesi D, Feng H. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *Journal of Andrology* 2007; 28; 481 – 489.
  40. Benchaib M., Braun V., Lornage J et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction* 2003; 18 (5); 1023 – 1028
  41. Azzi, A. ,Stroker, A. Vitamin E: non antioxidant roles. *Prog Lipid Res.* 2000; 39; 231 – 255.
  42. Greco E., Romano S., Iacobelli M et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reproduction* 2005; 20 (9); 2590 – 2594.
  43. Silver E., Eskenazi B., Evenson D et al. Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in health non smoking men. *Journal of Andrology* 2005; 26 (4); 550 – 556.
  44. Lopes S., Jurisicova A., Sun J et al. Reactive oxygen species potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* 1998; 13 (4); 896 – 900.
  45. Sergerie M., Ouhilal S., Bissonnette F et al. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Human Reproduction* 2000; 15 (6); 1314 – 1321.

46. Greco E., Iacobelli M., Rienzi L. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *Journal of Andrology* 2005; 26 (3); 349 – 353