



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO DE  
MUESTRAS DEL BANCO DE SEMEN Y SU CAPACIDAD DE  
FERTILIZACIÓN EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGA**

PRESENTA

**ALEXIS PAULINA ORTEGA GARCÍA**

DIRECTOR DE TESIS

**M. en C. Pedro Cuapio Padilla**

Instituto Valenciano de Infertilidad, México

ASESORA INTERNA

**Dra. Patricia Rosas Saucedo**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM





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.

## **JURADO ASIGNADO**

- Presidente: Dra. Patricia Rosas Saucedo
- Vocal: M. en C. Pedro Cuapio Padilla
- Secretario: Dra. Leticia Morales Ledesma
- 1er suplente: Dra. Elia Roldán Reyes
- 2do suplente: Bióloga María Cristina Alvarado Domínguez

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA**

Instituto Valenciano de Infertilidad, México y Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis el M. en C. Pedro Cuapio Padilla y mi asesora interna la Dra. Patricia Rosas Saucedo por compartir su conocimiento, experiencia y amistad durante la realización de mi tesis.

A la Dra. Leticia Morales Ledesma, Dra. Elia Roldán Reyes y Bióloga María Cristina Alvarado Domínguez por sus observaciones y comentarios que me ayudaron a mejorar mi tesis.

Al M. en C. Armando Cervantes Sandoval por su apoyo en la parte estadística de mis resultados.

A mis amigos y compañeros de la secundaria, prepa y universidad que de cierta manera influyeron para alcanzar este logro.

A mi compañero y amigo Roberto con quién trabaje durante la realización de mi tesis y por los gratos momentos vividos durante la realización de mi tesis.

A Luis, Héctor y Ricardo del IVI, México por sus comentarios que contribuyeron en la realización de mi tesis.

Este trabajo ha sido posible gracias al Instituto Valenciano de Infertilidad y la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

## **DEDICATORIAS**

*Si solo pudiera decir una última palabra en mi vida sería “Gracias”,  
y sería para ustedes.*

### **A mi mamá, Callita y Nande**

Gracias por todo su apoyo y confianza que me han brindado durante toda mi vida pero sobre todo gracias por todo su amor y cariño, ustedes son parte fundamental de mis logros y hoy en día soy quien soy gracias a ustedes, los amo.

### **A toda mi familia**

Gracias a todos y cada uno de ustedes porque desde pequeña su apoyo, su confianza y su cariño me han alentado en mi formación, los quiero mucho y espero que les sirva de ejemplo para los que van en camino.

### **A Javier**

Sin conocer nada de ti hoy en día eres una persona muy importante para mi, gracias por ser parte de mi vida, gracias por todo tu amor, tu apoyo y tu confianza, te amo.

### **A mi tío Juan**

En tu memoria una dedicatoria especial para ti, te lo prometí.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Páginas</b>
<b>I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>II. RESUMEN</b> .....	ii
<b>III. MARCO TEÓRICO</b> .....	1
1. Sistema reproductor masculino .....	1
Testículos .....	1
Órganos accesorios.....	2
Esteroidogénesis .....	3
Espermatogénesis .....	4
Espermatozoide .....	5
Semen .....	6
2. Regulación neuroendocrina .....	6
3. Infertilidad masculina .....	8
Evaluación del varón infértil.....	10
4. Reproducción humana.....	13
Desarrollo embrionario .....	14
Técnicas de Reproducción Humana Asistida (TRHA).....	15
De la fecundación al blastocisto en las TRHA .....	17
5. Características del ADN .....	18
6. Fragmentación del ADN .....	19
Mecanismos de fragmentación del ADN en espermatozoides .....	20
Impacto del daño en el ADN espermático y los resultados de la TRHA.....	22
Relación entre fragmentación del ADN espermático y desarrollo embrionario. ....	22
Técnicas de estudio de la fragmentación del ADN espermático .....	23
Prueba de dispersión de la cromatina del espermatozoide (SCD: <i>Sperm Chromatin Dispersion</i> ).....	25
7. Criopreservación de espermatozoides.....	26
8. Banco de semen .....	27
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	29
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	30
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	31
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	32
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	38
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	47
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	51
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	52

## I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- **ABP:** Proteína fijadora de andrógenos
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **BC:** Blastocisto cavitado
- **BE:** Blastocisto expandido
- **BHi:** Blastocisto en eclosión
- **BT:** Blastocisto temprano
- **CP:** Corpúsculo polar
- **DBD-FISH:** Detección de la rotura de ADN por Hibridación *in situ* con fluorescencia (*DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization*)
- **DFI:** Índice de fragmentación del ADN
- **DHT:** Dihidrotestosterona
- **EO:** Estimulación ovárica
- **ERO:** Especies reactivas de oxígeno
- **FIV:** Fecundación *in vitro*
- **FIV-TE:** Fecundación *in vitro* con Transferencia de Embriones
- **FSH:** Hormona estimuladora de los folículos
- **GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas
- **IA:** Inseminación artificial
- **ICSI:** Inyección intracitoplasmática del espermatozoide
- **IUI:** Inseminación intracervical o intrauterina
- **ISNT:** Desplazamiento de la rotura *in situ* (*In Situ Nick Translation*)
- **LDL:** Lipoproteínas de baja densidad
- **LH:** Hormona luteinizante
- **NT:** No transferencia de embriones
- **OHSS:** Síndrome de hiperestimulación ovárica
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **OVODON:** Óvulos de donantes
- **PN:** Pronúcleo
- **RNV:** Recién nacido vivo producto único
- **RNV2:** Recién nacido vivo producto gemelar
- **SCD:** Prueba de dispersión de la cromatina del espermatozoide (*Sperm Chromatin Dispersion*)
- **SCP2:** Proteína transportadora de esteroides
- **SCSA:** Ensayo de la estructura de la cromatina del espermatozoide (*Sperm Chromatin Structure Assay*)
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **TRHA:** Técnicas de reproducción humana asistida
- **TSH:** Hormona estimulante de la tiroides
- **TUNEL:** Marcación de extremos rotos de ADN por transferasa terminal y dUTP (*Terminal dUTP Nick-End Labeling*)
- **VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana

## II. RESUMEN

En la actualidad la infertilidad es un problema común que afecta al 15% de las parejas. El factor masculino es responsable del 30 ó 40% de los casos.

La criopreservación de los espermatozoides en los bancos de semen puede ser de ayuda para cualquier programa de reproducción asistida, sin embargo, las Técnicas de Reproducción Humana Asistida (TRHA) suponen un salto en los mecanismos de selección espermática natural y permiten incrementar las posibilidades de que un espermatozoide pueda fertilizar un óvulo con material genómico alterado.

Dado que la transmisión de la molécula del ADN íntegra e intacta del espermatozoide al ovocito es esencial para la consecución y desarrollo del embarazo, su rotura podría conllevar alteraciones en la fertilización y desarrollo embrionario consiguiente, de ahí el interés en desarrollar técnicas analíticas encaminadas a medir la fragmentación del ADN espermático e incluirlas en el estudio del factor masculino.

Por lo anterior, en el presente estudio se analizó el Índice de Fragmentación del ADN (DFI) de los espermatozoides de donantes de banco de semen, utilizando la Prueba de dispersión de la cromatina del espermatozoide en muestras en fresco y post descongeladas y se evaluó si el proceso de criopreservación altera los parámetros convencionales de semen y su capacidad de fertilización en técnicas de reproducción asistida.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el proceso de criopreservación incrementa significativamente el DFI espermático en comparación con las muestras en fresco, mientras que los parámetros de concentración y movilidad en espermatozoides disminuyen, además tanto el DFI espermático y la movilidad del espermatozoide se encuentran correlacionados. También se pudo observar que cuando se utilizan óvulos de pacientes u óvulos de donantes tanto en FIV como en ICSI existe una correlación negativa entre la fragmentación del ADN espermático y los resultados de las TRHA como es desarrollo embrionario y tasas de embarazo.

Dado que existe relación entre la fragmentación del ADN espermático con la movilidad del espermatozoide, desarrollo embrionario así como con las tasas de embarazo, el análisis de este parámetro podría ayudar a una mayor eficiencia en las técnicas de reproducción asistida.



### III. Marco Teórico

#### 1. Sistema Reprodutor Masculino

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

El aparato genital masculino (**Figura 1**) está formado por los testículos, las vías espermáticas, las glándulas sexuales anexas (vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales) y el pene (Ross y Pawlina, 2004).

#### Testículos

Los testículos son órganos ovoides pares que están suspendidos fuera de la cavidad abdominal (**Figura 1**). Tienen un diámetro mayor de unos 4 cm, 3 cm de ancho y un espesor de 2,5 cm y cada uno de ellos pesa alrededor de 20 g (Ross y Pawlina, 2004).

Las dos funciones del testículo son la producción de espermatozoides (espermatogénesis) y la síntesis de hormonas sexuales masculinas (esteroidogénesis). Estas dos actividades se realizan en compartimentos diferentes, la espermatogénesis en los túbulos seminíferos y la esteroidogénesis en las células de Leydig en el intersticio.

Los testículos están rodeados por la cápsula testicular compuesta de tres capas: túnica vaginal, túnica albugínea y túnica vasculosa. En conjunto actúan como membrana dinámica capaz de contracciones periódicas, además de intervenir en varios aspectos de la fisiología testicular (Lesson y Lesson, 1984; Bellido, 1999; Ross y Pawlina, 2004).

La túnica albugínea se proyecta al interior del testículo para formar tabiques conjuntivos que se dividen en aproximadamente 250 compartimientos piramidales conocidos como lobulillos testiculares. Cada lobulillo testicular consiste de uno a cuatro túbulos seminíferos en cuyas paredes se producen los espermatozoides a partir de células germinales primitivas (espermatogénesis) y un estroma de tejido conjuntivo en la que hay células intersticiales de Leydig (Lesson y Lesson, 1984; Guyton, 2001; Ganong, 2004).

Cada túbulo seminífero tiene una longitud que van de 30 a 70 cm y un diámetro de entre 150 y 250  $\mu\text{m}$  y está revestido por epitelio germinativo o seminífero complejo, que es un epitelio cúbico estratificado complejo (Lesson y Lesson, 1984; Ross y Pawlina, 2004).

El epitelio está cubierto hacia fuera por una zona especializada de tejido fibroso llamado tejido peritubular. En los seres humanos el tejido peritubular esta compuesto por células mioideas y fibrillas colágenas, las contracciones rítmicas de éstas modifican el diámetro del túbulo seminífero que contribuye al movimiento de los espermatozoides y el líquido testicular a lo largo de los túbulos seminíferos hacia la vía espermática. Por fuera de la capa miodea hay un sistema extenso de vasos sanguíneos y linfáticos llamado tejido intersticial. El epitelio seminífero está compuesto por dos poblaciones celulares básicas, las células de Sertoli y las espermatogonias (Lesson y Lesson, 1984; Ross y Pawlina, 2004).

Las **células de Sertoli** son células con prolongaciones apicales y laterales extensas que se fusionan por medio de uniones herméticas, lo que le permite rodear a las células espermatogonias contiguas y ocupar los espacios entre éstas, esta configuración es lo que le imparte una organización estructural a los túbulos porque se extienden por todo el espesor del epitelio seminífero (Lesson y Lesson, 1984; Ross y Pawlina, 2004).

Las células de Sertoli tienen un importante papel nutricional: sintetizan transferrina, inhibina, proteína fijadora de andrógenos (ABP) y factores de crecimiento y permanecen en contacto con las células germinales para que estas puedan sobrevivir además de participar en la división celular (Lesson y Lesson, 1984).

En el testículo entre los túbulos seminíferos se encuentra el tejido intersticial. La presencia de células intersticiales de Leydig es el carácter notable de este tejido (Levy y col., 2006).

Las **células de Leydig** son células poliédricas grandes que de manera característica contienen inclusiones lipídicas. Se encuentran en grupos compactos, por lo general en zonas angulares creadas por la disposición íntima de los túbulos seminíferos (Lesson y Lesson, 1984; Ross y Pawlina, 2004).

Las células de Leydig se diferencian y secretan testosterona desde las primeras etapas de la vida fetal. La secreción de testosterona es necesaria durante el desarrollo embrionario, en la maduración sexual y en la función reproductora (Ross y Pawlina, 2004).

### Órganos accesorios

El **sistema de conductos** está formado por el epidídimo, el conducto deferente y el conducto eyaculador (**Figura 1**). La red testicular está unida al epidídimo por los conductos deferentes. El epidídimo es una estructura apoyada sobre la superficie superior y posterior del testículo y mide aproximadamente 7.5 cm de longitud y se divide en tres segmentos: inicial, medio y terminal; los segmentos inicial y medio intervienen en el proceso de maduración del espermatozoide, mientras que el terminal sirve de almacén para los espermatozoides maduros hasta el eyaculado. A partir de ese punto, los espermatozoides pasan hacia el conducto deferente (Guyton, 2001; Ganong, 2004).

El conducto deferente, en el ser humano tiene unos 25 cm de longitud, en su porción terminal se forma una ampolla que sirve de almacén de espermatozoides. Esta ampolla se une al conducto de la vesícula seminal y forma al conducto eyaculador que continua hasta la uretra a través de la próstata. El conducto eyaculador es un segmento terminal corto en cada conducto genital (Lesson y Lesson, 1984; Bellido, 1999; Ross y Pawlina, 2004).

Las **glándulas sexuales** asociadas con los sistemas de conductos testiculares son las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales (**Figura 1**).

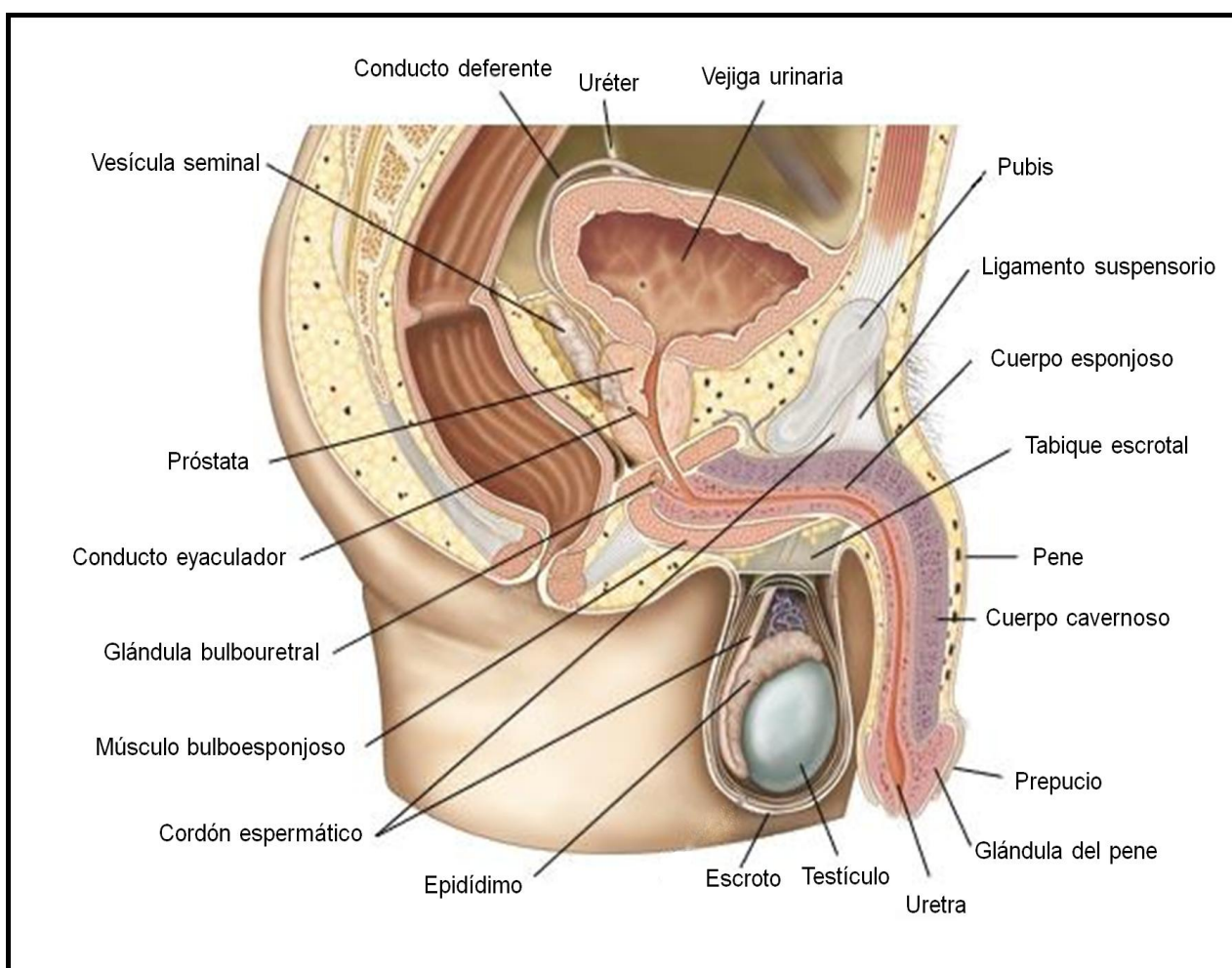
Las **vesículas seminales** son dos glándulas tubulares alargadas y muy tortuosas localizadas a cada lado de la próstata. Bajo la acción de la testosterona secretan un líquido amarillento alcalino y viscoso que compone el líquido seminal (Guyton, 2001).

La contracción de la cubierta muscular lisa de las vesículas seminales durante la eyaculación expulsa su secreción hacia el extremo prostático de la ampolla, y el contenido de la ampolla así como el de la vesícula seminal pasan a los conductos eyaculadores que atraviesan el cuerpo de la glándula prostática y contribuye a evacuar los espermatozoides de la uretra (Lesson y Lesson, 1984; Bellido, 1999; Guyton, 2001; Ross y Pawlina, 2004).

La **próstata** es un órgano dependiente de andrógenos que rodea a la uretra y contiene entre 30 y 50 glándulas tubuloalveolares cuyos conductos desembocan en la uretra prostática; la secreción prostática es un líquido lechoso con un pH aproximado de 6.5. Durante la emisión, la cápsula de la glándula prostática se contrae simultáneamente con el conducto deferente, de forma que el líquido poco denso, lechoso, de la glándula prostática contribuye aún más al volumen del semen (Lesson y Lesson, 1984; Bellido, 1999; Guyton, 2001; Ross y Pawlina, 2004).

Las **glándulas bulbouretrales**, también llamadas glándulas de Cowper, son órganos pares, de 0.5 cm de diámetro, que se encuentran por detrás de la uretra. Secretan en la uretra un líquido claro, alcalino de tipo mucoso, con alto contenido de galactosa, galactosamina, ácido galacturónico, ácido siálico y metilpentosa. La estimulación sexual hace que se libere la secreción, que constituye la porción principal del líquido preseminal y es probable que sirva para lubricar la uretra esponjosa antes de que llegue el eyaculado (Lesson y Lesson, 1984; Bellido, 1999; Ross y Pawlina, 2004).

El **pene** es un órgano genital externo, eréctil, altamente vascular, que permite el depósito de los espermatozoides en el conducto vaginal femenino (**Figura 1**). Este órgano consiste principalmente de dos masas dorsales de tejido eréctil llamados cuerpos cavernosos y una masa ventral del mismo tejido llamada cuerpo esponjoso en el que está incluido el segmento esponjoso de la uretra. Los cuerpos cavernosos contienen abundantes espacios vasculares que aumentan de tamaño y adquieren mayor rigidez al llenarse de sangre que proviene sobre todo de las arterias helicinas. Estas arterias se dilatan durante la erección para aumentar el flujo sanguíneo al pene (Bellido, 1999; Ross y Pawlina, 2004).



**Figura 1.** Aparato reproductor masculino (Tomado y modificado de Encyclopedia Britannica, 2007).

### Esteroidogénesis

Las células de Leydig sintetizan y liberan varias hormonas esteroideas conocidas como andrógenos (testosterona, dihidrotestosterona y androstenediona). La testosterona es el principal andrógeno testicular, el 95% presente en el plasma de varones es sintetizada en los testículos (Bellido, 1999).

Las células de Leydig, aunque pueden sintetizar colesterol a partir de acetil-CoA, lo obtienen fundamentalmente del plasma, a partir de los ésteres de colesterol que forman parte de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL se introducen a la célula por endocitosis mediada por receptor; los ésteres de colesterol pueden almacenarse en gotas de lípidos o convertirse en colesterol libre para ser utilizado en la síntesis de las hormonas esteroideas (Bellido, 1999).

La transformación del colesterol en pregnenolona, es el paso limitante en la biosíntesis de testosterona y se realiza en la mitocondria, por lo que el colesterol debe ser transportado e internalizado en la mitocondria (Bellido, 1999).

La pregnenolona es liberada de la mitocondria y pasa al retículo endoplásmico liso, donde se completa la esteroidogénesis. Dos rutas metabólicas conducen a la síntesis de testosterona en el testículo, una a partir de 17-hidroxi-pregnenolona, conocida como la ruta  $\Delta 5$ , y otra a partir de 17-hidroxi-progesterona o  $\Delta 4$ ; los esteroides intermediarios de la ruta  $\Delta 5$  pueden convertirse en el  $\Delta 4$  correspondiente (Bellido, 1999).

La testosterona puede seguir dos rutas metabólicas y transformarse en otros esteroides biológicamente activos. Por la ruta de la  $5\alpha$  reductasa se transforma primero en dihidrotestosterona (DHT) y a continuación en  $3\alpha$  diol y por la ruta de la aromatasas, la testosterona se transforma en estradiol y la androstenediona en estrona (Bellido, 1999).

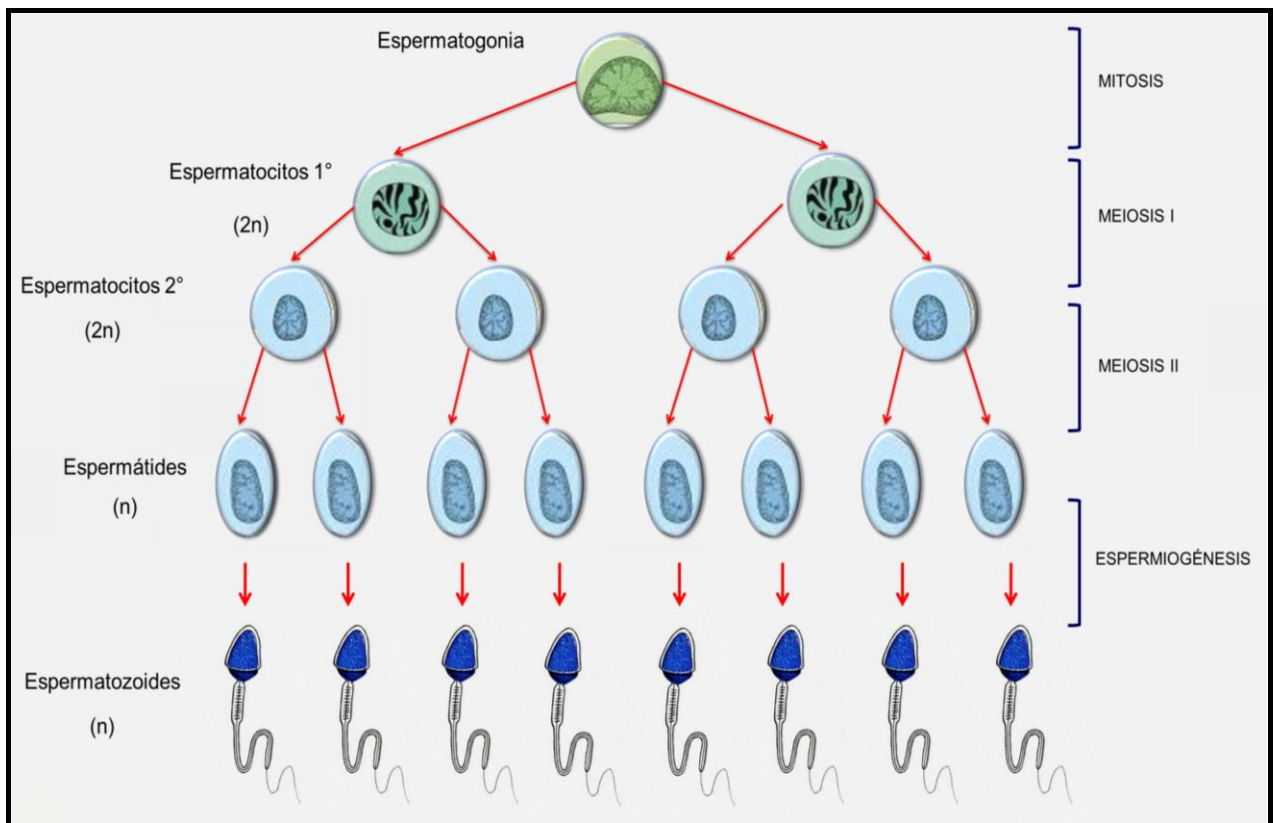
## **Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual las espermatogonias se transforman en células germinales maduras o espermatozoides (Málaga y col., 2005) (**Figura 2**).

Ocurre en los túbulos seminíferos durante la vida sexual activa, como consecuencia del estímulo producido por las hormonas gonadotrópicas de la hipófisis anterior. Estos túbulos tienen gran número de células pequeñas y medianas denominadas espermatogonias, una parte de ellas se replican por mitosis y mantiene su número formando dos o tres capas a lo largo del borde externo del epitelio tubular y la otra parte de espermatogonias se diferencian siguiendo las etapas del desarrollo para formar espermatozoides (Málaga y col., 2005).

Durante la primera etapa de la espermatogénesis las espermatogonias primitivas, localizadas junto a la membrana basal del epitelio llamadas espermatogonias tipo A, se dividen y originan células un poco más diferenciadas (espermatogonias tipo B). En el compartimiento adluminal, después de varias divisiones adicionales estas células se convierten en espermatocitos primarios (número diploide de cromosomas), los que se a su vez mediante la primera división meiótica se dividen para formar dos espermatocitos secundarios (número haploide, uno con el cromosoma sexual X y otro con el Y) y mediante una segunda división meiótica los espermatocitos secundarios generan cuatro espermátides (Málaga y col., 2005).

Finalmente cada espermátide cambia gradualmente hasta convertirse en un espermatozoide maduro, por medio de la pérdida de citoplasma, reorganización del material cromatínico del núcleo, formación de una cabeza compacta, acumulación del citoplasma residual y de la membrana celular en un extremo de la célula para formar la cola. Esta serie de cambios morfológicos se le conoce como espermiogénesis. El proceso completo de la espermatogénesis hasta la espermiogénesis dura aproximadamente 75 días (Málaga y col., 2005).



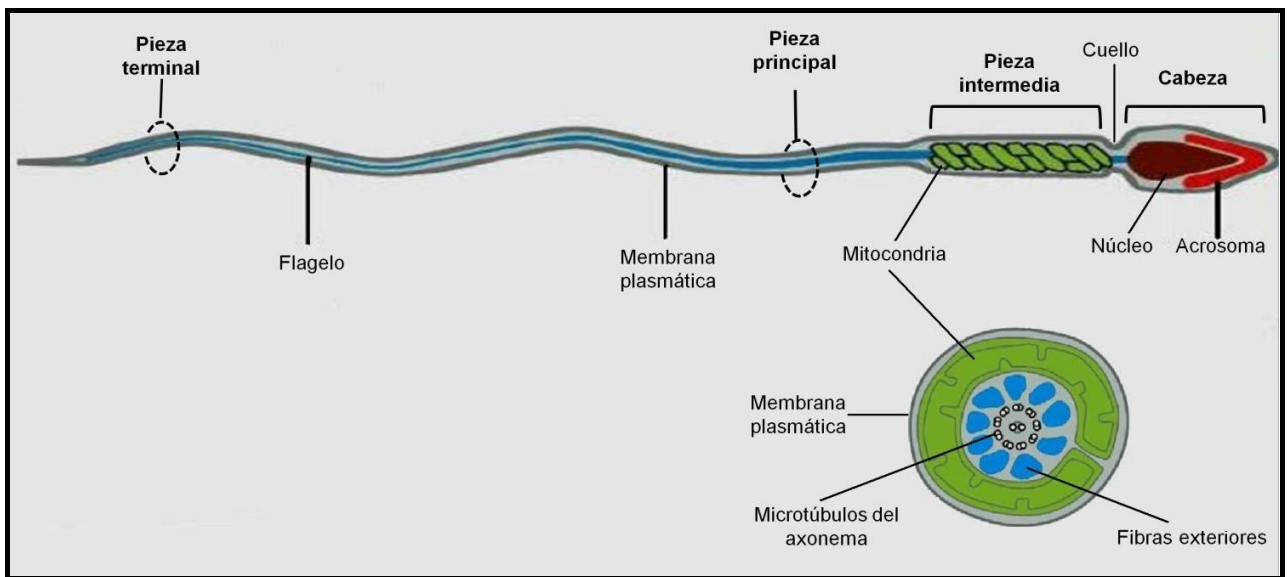
**Figura 2.** Etapas de la espermatogénesis humana (Tomado y modificado de Sadler y col., 2004).

### Espermatozoide

El espermatozoide humano maduro tiene unos 60  $\mu\text{m}$  de longitud, incluye cabeza, pieza intermedia y cola (Ross y Pawlina, 2004) (**Figura 3**).

En la cabeza del espermatozoide se encuentra el núcleo que contiene el ADN condensado y el acrosoma denso en su margen anterior. Su cabeza es aplanada y puntiaguda y mide 4.5  $\mu\text{m}$  de largo por 3  $\mu\text{m}$  de ancho por 1  $\mu\text{m}$  de espesor. El casquete acrosómico es una cobertura de la cabeza, a manera de gorra que cubre los dos tercios anteriores del núcleo (**Figura 3**); es un organelo similar a un lisosoma, rico en hialuronidasa, neuraminidasa, fosfatasa ácida y una proteasa similar a la tripsina llamada acrosina. El primer paso de la reacción acrosómica es la liberación de estas enzimas, cuando el espermatozoide entra en contacto con el óvulo estas enzimas facilitan la penetración del espermatozoide a la membrana pelúcida y la posterior fecundación, y a su vez impide la entrada de otros espermatozoides en el óvulo (Ganong, 2004; Ross y Pawlina, 2004).

La cola del espermatozoide está subdividida después del cuello en pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. El cuello contiene los centríolos y el origen de las fibras gruesas. La pieza intermedia es de alrededor de 7  $\mu\text{m}$  de longitud y contiene las mitocondrias dispuestas en forma helicoidal alrededor de las fibras gruesas y del complejo axonémico (**Figura 3**). Estas mitocondrias proveen la energía para el movimiento de la cola y por ende son la causa de la movilidad del espermatozoide. La pieza principal mide alrededor de 40  $\mu\text{m}$  de longitud y contiene la vaina fibrosa por fuera de las fibras gruesas y del complejo axonémico. La pieza terminal, que corresponde aproximadamente a los últimos 5  $\mu\text{m}$  del flagelo en el espermatozoide maduro, sólo contiene el complejo axonémico (Ross y Pawlina, 2004).



**Figura 3.** Estructura del espermatozoide humano (Tomado y modificado de Navarro, 2009).

## Semen

El semen es una mezcla de espermatozoides y líquido seminal, el cual está formado por las secreciones de los túbulos seminíferos, las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales (Poirot y Cherruau, 2005).

El semen tiene un pH ligeramente básico, resultado de la acidez prostática y de la alcalinidad vesicular. Las secreciones de la próstata le dan una apariencia blanquecina y los líquidos de las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales le dan una consistencia viscosa. El líquido seminal proporciona a los espermatozoides un medio de desplazamiento, medio nutritivo y protección frente al medio ácido hostil que representan la uretra masculina y la vagina femenina (Poirot y Cherruau, 2005).

El líquido seminal está compuesto de:

- Minerales:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ .
- Glúcidos: glucosa, fructosa.
- Ácidos orgánicos: ácido cítrico, ácido ascórbico.
- Lípidos: colesterol, glicerofosforilcolina.
- Esteroides: testosterona; deshidroepiandrosterona.
- Constituyentes de pequeña masa molecular: aminoácidos, carnitina, espermidina, espermina, glutatión.
- Proteínas: albúmina,  $\alpha$  globulina,  $\beta$  globulina,  $\gamma$  globulina.
- Más de 50 enzimas: hidrolasas, deshidrogenasas, etc.
- Prostaglandinas (Poirot y Cherruau, 2005).

## 2. Regulación Neuroendocrina

El eje neuroendócrino que regula la reproducción en el varón está formado fundamentalmente por el sistema nervioso central (SNC), la hipófisis anterior y los testículos.

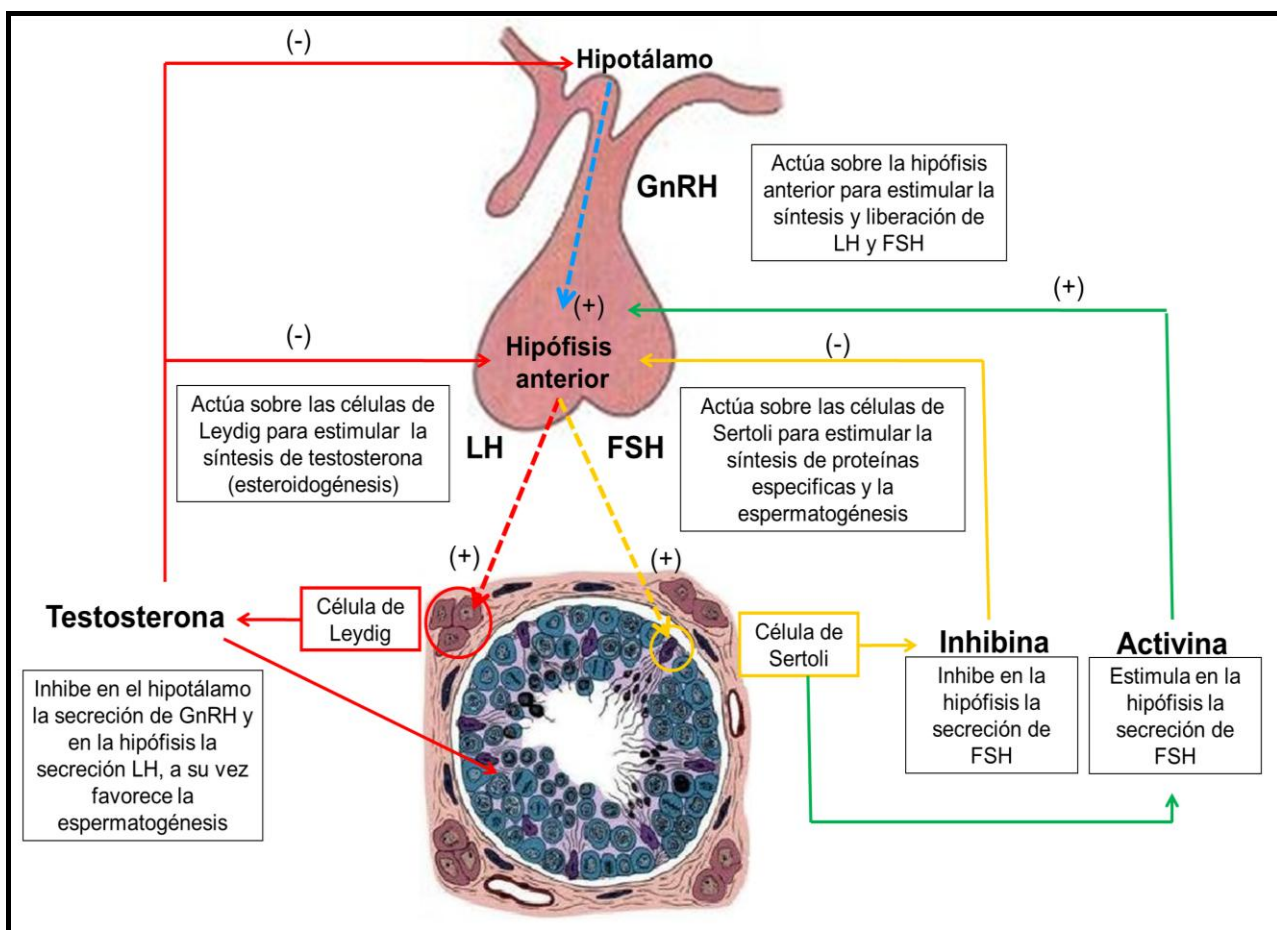
El hipotálamo integra las señales procedentes del SNC y de la periferia, éste secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) al sistema vascular hipotálamo-hipofisario para que la transporte a la hipófisis anterior. La secreción intermitente y pulsátil de este deca péptido provoca la

liberación episódica y simultánea de la hormona luteinizante (LH) y con menor sincronía y la quinta parte de potencia, la de la hormona estimulante de los folículos (FSH) (Steven y Grace, 1998).

La LH y la FSH son glucopéptidos producidos por las células gonadotrópicas de la hipófisis anterior y se secretan con un patrón pulsátil (Lavin, 2003).

La LH se une a receptores de membrana específicos y de alta afinidad en las células de Leydig. La unión estimula la síntesis y liberación de testosterona (esteroidogénesis), mientras que la FSH se une a receptores de las células de Sertoli y estimula la síntesis de un gran número de proteínas específicas, tales como la proteína fijadora de andrógenos (ABP), inhibina, activina, etc. La FSH estimula la aromatización de la testosterona a estradiol en las células de Leydig y estimula la espermatogénesis. La estimulación gonadotrópica provoca la liberación de estas hormonas a la vena espermática (Steven y Grace, 1998; Yen y col, 2001; Lavin, 2003).

A su vez, la secreción de LH y FSH por la hipófisis está controlada por la testosterona y sus productos metabólicos mediante mecanismos de retroalimentación negativa. La testosterona actúa principalmente sobre el hipotálamo para regular la secreción de GnRH, reduciendo de este modo la frecuencia de los pulsos de liberación de LH. La inhibina y la activina son glucoproteínas que participan en la regulación de la secreción de FSH. La inhibina B, producida por las células de Sertoli, entra en la circulación periférica e inhibe la secreción hipofisiaria de FSH. La activina estimula la secreción de FSH (**Figura 4**). Con estos circuitos de retroalimentación endocrina, la función testicular en general y la secreción de testosterona en concreto se mantienen en un nivel relativamente estable (Steven y Grace, 1998; Lavin, 2003).



**Figura 4.** Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo (Tomado y modificado de Junqueira y Carneiro, 2005).

### 3. Infertilidad masculina

La fertilidad se define como la capacidad para concebir y procrear, por lo tanto la infertilidad es una disminución de la capacidad para llevar a cabo estas funciones (Yen y col., 2001).

En el humano se define infertilidad como la ausencia de embarazo tras un año de mantener relaciones sexuales sin utilizar medios anticonceptivos y es un problema común que afecta al 15% de las parejas. El factor masculino es responsable del 30 ó 40% de los casos. La infertilidad se considera primaria cuando la pareja logra fecundación natural pero los embriones no se desarrollan y no llegan a término, mientras que la infertilidad secundaria es cuando la pareja ya tuvo hijos y posteriormente, por alguna razón, presentan problemas para embarazarse (García y col., 2010).

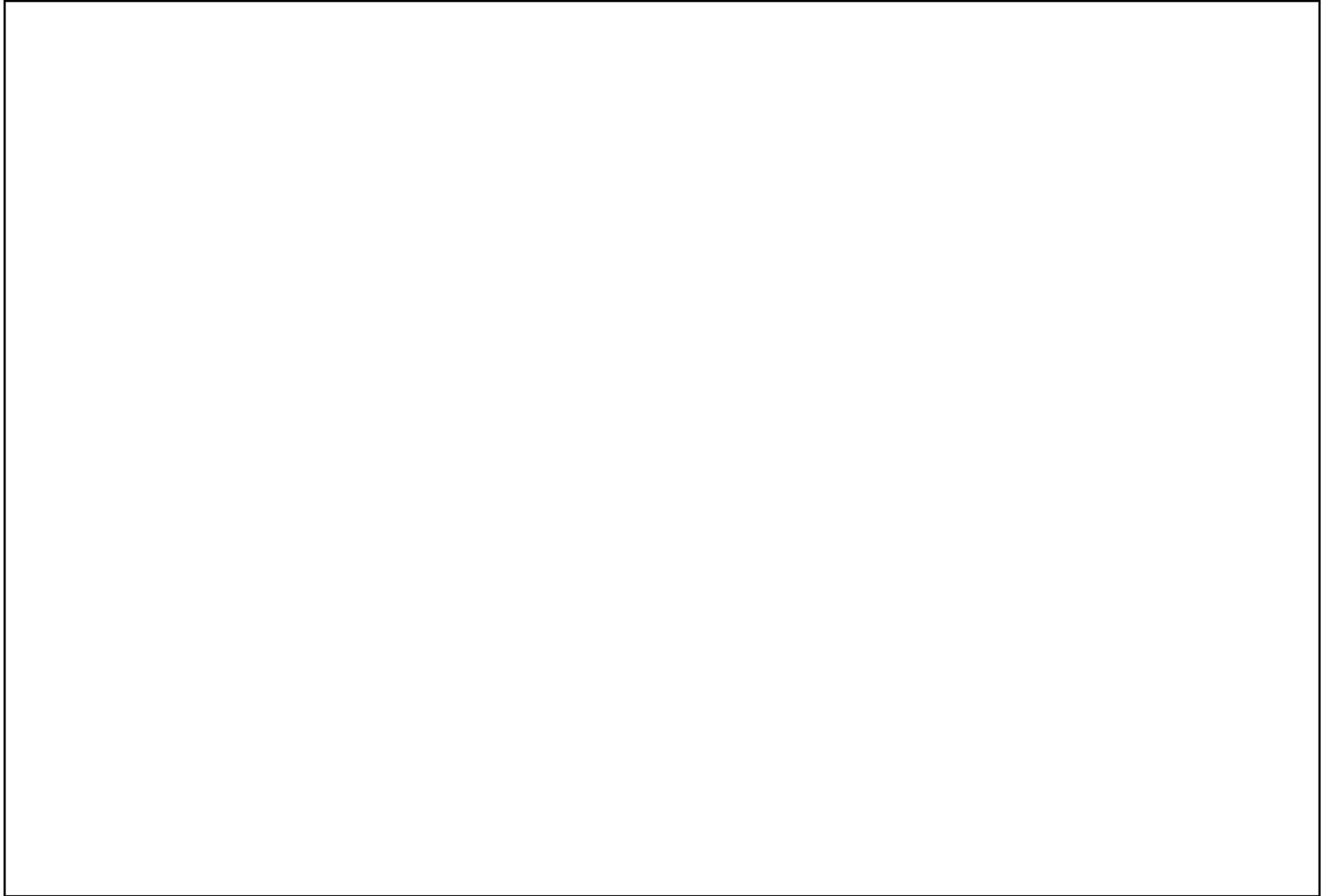
Como se aprecia en el **Cuadro I**, la fertilidad masculina puede verse reducida como consecuencia de infecciones genitourinarias, varicocele, trastornos endocrinos, anomalías genéticas, factores inmunitarios, disfunción eyaculatoria entre otros factores (Dohle y col., 2010).

Aproximadamente el 15% de las parejas, inclusive cuando se han considerado todos los factores antes mencionados, pueden no exhibir alteración objetiva que lleve a un diagnóstico definitivo. Entonces son clasificados como pacientes con infertilidad idiopática o inexplicada, por lo menos al momento del diagnóstico (Brugo y col., 2003).

Alrededor del 50% de los casos de infertilidad masculina siguen sin explicación. Pero aumenta la evidencia de que una gran proporción de los casos de infertilidad idiopática se asocian con anormalidades genéticas y moleculares como son defectos en la cromatina, evaluados como roturas del ADN nuclear de los espermatozoides (Gama y col., 2009; Bungum y col., 2011).



**Cuadro I.** Resumen de las diferentes causas de infertilidad Masculina.



## Evaluación del varón infértil

La evaluación del paciente infértil se basa en 4 estudios: historia clínica, examen físico, seminograma y perfil hormonal (Poirot y Cherruau, 2005).

La historia clínica permite la investigación de los factores de riesgo de la infertilidad. Tiene que ser tan completa como sea posible. En efecto, excepto causas específicas, una patología general puede repercutir en la espermatogénesis (Poirot y Cherruau, 2005).

En lo que respecta a la exploración física, ésta debe ser completa observando la normalidad de los caracteres sexuales secundarios y examinando el pene, los testículos, los epidídimos y conductos deferentes, así como el tacto rectal obligatorio para descartar patología prostática o seminal (García y col., 2010).

De primera intención el seminograma, es la primera etapa biopatológica de la exploración de la fertilidad masculina. Este examen permite orientar hacia una participación masculina en la infertilidad de pareja o bien en confirmarla. También es el punto de partida de un proceso etiológico (Tapia y Rojas, 2003).

Se deben realizar al menos 2 seminogramas (separados como mínimo 1 mes), analizándose de acuerdo a la descripción de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2010 y actualizada por las Guías de la Asociación Europea de Urología de 2010 (García y col., 2010).

El examen básico de semen debe incluir datos macroscópicos (licuefacción, viscosidad, aspecto, pH y volumen) y microscópicos (concentración, motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides, presencia de leucocitos, presencia de aglutinación). Los índices normales se muestran en el **Cuadro II** (García y col., 2010).

**Cuadro II.** Índices de normalidad del semen (WHO, 2010).

Parámetros	Valores Normales
Volumen	≥1.5 ml
pH	7.2
Concentración de espermatozoides	≥15 × 10 <sup>6</sup> /ml
Recuento total de espermatozoides	≥39 ×10 <sup>6</sup> /eyaculado
Movilidad	≥40% de movimiento lineal
Morfología	≥4%
Vitalidad	≥58% de espermatozoides
Leucocitos	< 1 × 10 <sup>6</sup> /ml

Con base en las alteraciones en los índices del análisis de semen se muestra la nomenclatura en el **Cuadro III** (Rosas, 2007).

**Cuadro III.** Nomenclatura de los índices del análisis de semen (WHO, 2010).

<b>Normospermia</b>	Parámetros de espermatozoides dentro de los límites normales.
<b>Oligospermia</b>	Concentración de espermatozoides inferior a 15 × 10 <sup>6</sup> .
<b>Astenospermia</b>	Movilidad lineal menor del 40%.
<b>Terastospermia</b>	Proporción inferior al 4% de espermatozoides morfológicamente normales.
<b>Oligoastenoteratozoospermia</b>	Alteraciones de la movilidad, concentración y morfología.
<b>Azoospermia</b>	Eyaculado sin espermatozoides.
<b>Aspermia</b>	Ausencia de eyaculado.

Los **índices macroscópicos** valoran la función de las células excretoras.

**Licuefacción:** Después de la emisión del semen la muestra sufre un proceso de coagulación presentándose como una masa firme, de superficie amorfa, que debido a la presencia de sustancias similares al fibrinógeno secretadas por las vesículas seminales, que se activan por enzimas proteolíticas segregadas por la próstata (proteasa, pepsinógeno, amilasa y hialuronidasa) la muestra de semen es licuada, es decir, pasa de un coagulo a una muestra en estado líquido. La ausencia de las vesículas seminales o próstata conduce a la falta de coagulación (Pires, 2010).

**Viscosidad:** La viscosidad hace referencia a la fluidez del semen, que después de la licuefacción debe ser ligeramente más viscoso que el agua. Para examinar la viscosidad, se comprueba la formación de hilos en la muestra. Si la muestra es altamente viscosa, puede deberse a una disfunción prostática (Poirot y Cherruau, 2005).

**Aspecto:** Una muestra de eyaculado normal es homogénea y tiene un aspecto gris-opalescente. Puede aparecer un color menos opaco si la concentración de espermatozoides es muy baja. Si la muestra está contaminada con sangre (hematospermia) presenta un color rosáceo. Una coloración del semen más amarilla se puede relacionar con contaminación de éste por orina o enfermedades como ictericia (WHO, 2010).

**Volumen:** El volumen medio del eyaculado es aportado principalmente por las vesículas seminales y la próstata, con una pequeña cantidad de las glándulas bulbouretrales y epidídimos. La medición precisa del volumen es fundamental en cualquier evaluación de semen porque permite que se calcule el número total de espermatozoides y las células no espermáticas en el eyaculado (**Cuadro II**) (WHO, 2010).

**pH:** El pH se determina por el equilibrio de las secreciones ácidas de la próstata y alcalinas de las vesículas seminales. Se mide dentro de la primera hora después de la eyaculación. Valores superiores pueden ser indicativos de infección y valores inferiores pueden revelar una disfunción, aplasia de las vesículas seminales o una obstrucción de los conductos eyaculatorio (**Cuadro II**) (Poirot y Cherruau, 2005; Pires, 2010).

Para el examen de los **índices microscópicos** se valoran:

**Concentración:** La determinación de la concentración de espermatozoides valora la función testicular y la permeabilidad de los conductos excretores, la concentración es uno de los principales parámetros utilizados para evaluar su viabilidad y capacidad para interactuar con los ovocitos, siendo un factor determinante del proceso reproductivo (**Cuadro II**) (Tapia y Rojas, 2003; Pires, 2010).

La concentración espermática se calcula rápidamente mediante el empleo de cámaras especializadas, como: Makler, Horwell, Petroff-Hausser, Microcell, el hemocitómetro de Neubauer o el portaobjetos de Chartpak (Teppa y Palacios, 2004).

**Movilidad:** La movilidad valora la función de los epidídimos y la interacción de los espermatozoides con el plasma seminal (Tapia y Rojas, 2003). Este estudio es cuantitativo al estimar el porcentaje de espermatozoides móviles y a la vez cualitativo al analizar el tipo de movimiento de los espermatozoides, el resultado se expresa en porcentaje (Poirot y Cherruau, 2005).

Según el tipo de movimiento la OMS clasifica a los espermatozoides en 4 categorías:

**a:** Móviles progresivos rápidos: se desplazan de forma rectilínea y rápida.

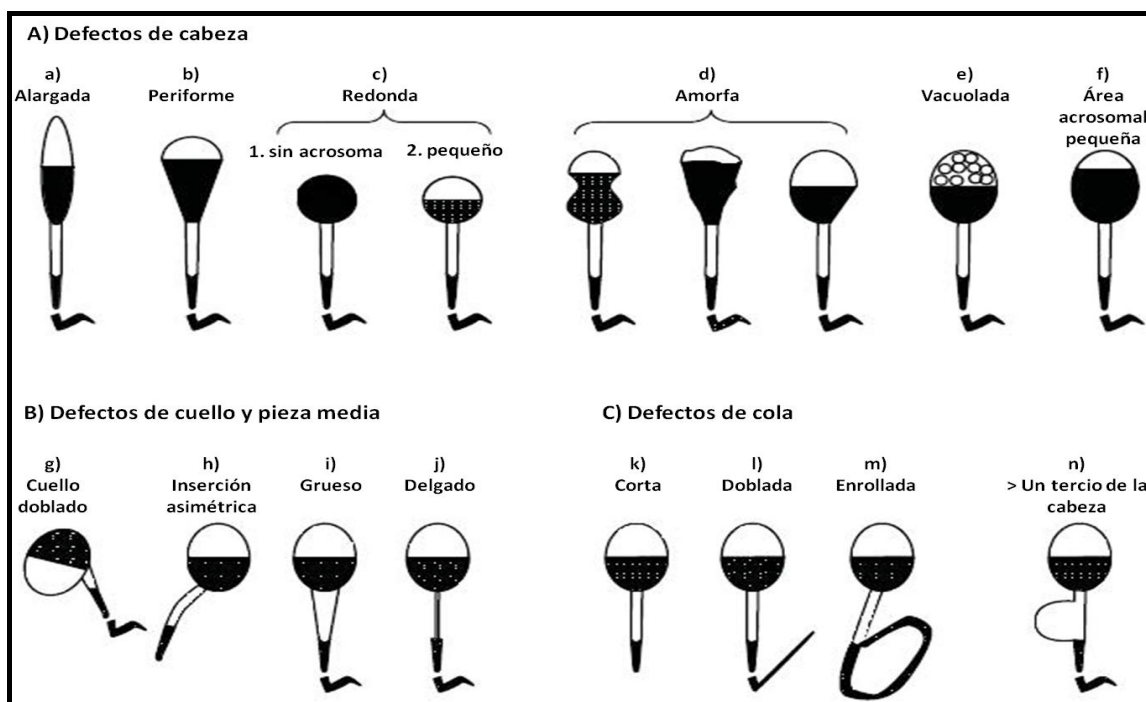
**b:** Móviles progresivos lentos: se desplazan más lentamente, de forma rectilínea o en curvas.

c: Móviles no progresivos: se mueven pero no cambian de posición, giran sobre su mismo eje.

d: Inmóviles: no se mueven.

**Morfología:** Existen varios tipos de clasificación. Morfológicamente, el espermatozoide está constituido por tres partes, cabeza, pieza intermedia y cola. Las anomalías se clasifican en defectos de la cabeza, de cuello y pieza media y de cola (**Figura 5**) (Poirot y Cherruau, 2005; WHO, 2010).

La morfología espermática se estudia en extensiones teñidas. La tinción de Papanicolaou es el método recomendado por la OMS, el cual permite la tinción de las regiones acrosómicas y post-acrosómicas de la cabeza, la gota citoplasmática, la pieza media y la cola. En algunos laboratorios se utilizan otros métodos de tinción rápida como el Diff-Quik (Dade Diagnosis, Miami, EE. UU.) o la tinción de Hemacolor para microscopía (Merck) (Pires, 2010).



**Figura 5.** Defectos morfológicos en los espermatozoides (Tomado y modificado de WHO, 2010).

**Vitalidad:** Las pruebas de vitalidad espermática, evalúan la integridad de la membrana del espermatozoide por exclusión de colorantes o por el hinchamiento de la membrana plasmática discriminando a los espermatozoides inmóviles de los vivos o muertos y se expresa en porcentaje de espermatozoides vivos (**Cuadro II**) (Tapia y Rojas, 2003; Teppa y Palacios, 2004).

**Concentración de células redondas:** El eyaculado invariablemente contiene otras células aparte de los espermatozoides. Las más comunes son las células epiteliales de la uretra, próstata o vesículas seminales, células de la línea germinal y leucocitos, todas llamadas células redondas. En el eyaculado los leucocitos están normalmente presentes en pequeñas cantidades (1 a 2%), valores superiores a un millón de leucocitos/ml puede ser indicativo de un proceso infeccioso en el tracto genito-urinario (Poirot y Cherruau, 2005; Pires, 2010).

**Agglutinación:** Significa que los espermatozoides móviles se juntan unos con otros cabeza-cabeza, cola-cola o cabeza cola. No se considera cuando los espermatozoides están inmóviles o unidos a otras células (Pires, 2010).

El perfil hormonal, en ciertas ocasiones, nos permitirá el diagnóstico de endocrinopatías causantes de la esterilidad, como determinados trastornos hipogonadotropos idiopáticos, aunque la mayoría de ellos se diagnostican durante la pubertad, como es el caso del síndrome de Kallmann (ausencia de la GnRH). También podemos descartar casos de deficiencia de la LH o de la FSH o se puede sospechar la existencia de tumores hipofisarios (Ruiz y Calatayud, 2009).

En general, es importante enfrentarse al problema de infertilidad masculina con el tratamiento adecuado a la causa específica; ahora bien, dado que en muchos casos no es posible determinar la etiología de la infertilidad o es irreparable se puede disponer de semen subfétil o se puede recurrir a banco de semen de donante junto con las técnicas de reproducción humana asistida (Rosas, 2007).

#### 4. Reproducción Humana

El proceso de formación de un individuo requiere la participación del ovocito, el gameto femenino que procede del evento de maduración folicular efectuado en el ovario. Por su parte, el semen contiene como elemento principal al gameto masculino, el espermatozoide, que deberá iniciar un largo recorrido a través del aparato genital femenino hasta el tercio superior de la trompa de Falopio donde ocurre la fecundación (Velázquez, 2009).

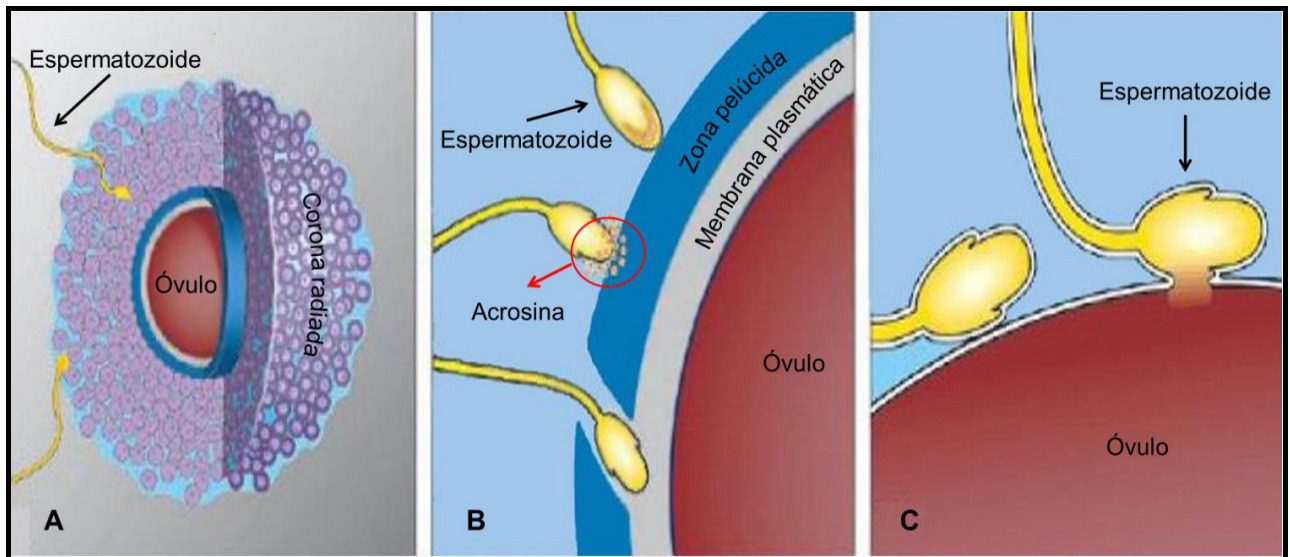
La fecundación es el evento fundamental del comienzo del desarrollo de un nuevo organismo e implica una serie coordinada de eventos y de interacciones celulares que permiten el encuentro entre el espermatozoide y el ovocito para formar el cigoto (Sgreccia y Carrasco, 2006; Velázquez, 2009).

En la descripción de los eventos que caracterizan el proceso de fecundación se puede realizar una distinción entre las etapas que preceden la fusión de los gametos y las modificaciones que preparan al embrión para la primera división celular.

La **reacción acrosomal** consiste en la liberación de enzimas líticas (hialuronidasa) por parte de la vesícula acrosomal del espermatozoide, que son capaces de dispersar las células de la corona radiada y permitir que el espermatozoide se abra camino hasta alcanzar la zona pelúcida, el estrato glicoprotéico que rodea el ovocito. La unión espermatozoide-zona pelúcida induce la activación y el desprendimiento de otra enzima acrosomal (acrosina) que facilita la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida, para excavar en ella un canal que le permita alcanzar la membrana plasmática, fundirse e incorporar su núcleo y el centriolo (Sgreccia y Carrasco, 2006) (**Figura 6**).

La **fusión de los gametos o singamia** es un proceso irreversible que marca el comienzo de un nuevo organismo: el cigoto o embrión unicelular. La primera consecuencia de la fusión de los gametos es la variación de la composición iónica del ovocito fecundado, ésta señala el comienzo de la activación del cigoto y del desarrollo embrionario, aboliendo los fenómenos inhibidores que habían determinado una reducida actividad metabólica del ovocito después de su expulsión del ovario (Sgreccia y Carrasco, 2006).

El aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  citoplasmático induce la reacción cortical que, por medio del endurecimiento de la zona pelúcida y la desactivación de las moléculas receptoras de espermatozoides, impide la unión y la entrada de otros espermatozoides (poliespermia), y permite la protección del nuevo individuo que comienza su ciclo vital (Sgreccia y Carrasco, 2006).



**Figura 6. (A)** Los espermatozoides superan el estrato de células de la corona radiada (en morado) para alcanzar la zona pelúcida (en azul); **(B)** reacción acrosomal y penetración de la zona pelúcida; **(C)** fusión de los gametos (Tomado y modificado de Sgreccia y Carrasco, 2006).

Después de la penetración del espermatozoide, inicia la **fase pronuclear**, el núcleo del ovocito completa su maduración, y ahora se le llama pronúcleo femenino. Mientras tanto, el núcleo masculino, que en el momento de su introducción en el ovocito estaba inerte, se transforma en un pronúcleo funcionalmente activo mediante modificaciones bioquímicas y estructurales que prevén la interacción con elementos moleculares de origen materno (Sgreccia y Carrasco, 2006).

### Desarrollo embrionario

El término embrión se utiliza para describir al producto de la fecundación, desde la primera división celular hasta los estadios iniciales del desarrollo de órganos (Velázquez, 2009).

Alrededor de 15 horas después de la fecundación, la formación y fusión de los pronúcleos masculino y femenino dan lugar a un nuevo y diferente grupo de cromosomas que regirán la vida y desarrollo del nuevo individuo que ha iniciado su desarrollo (Arteaga y col., 2007; Mercader y col., 2008) (**Figura 7**).

El cigoto se forma cuando el espermatozoide penetra al ovocito. Está compuesto de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares. El cigoto se forma cuando ocurre la rotura de la membrana pronuclear, durante este proceso ocurre la primera división (Velázquez, 2009) (**Figura 7**).

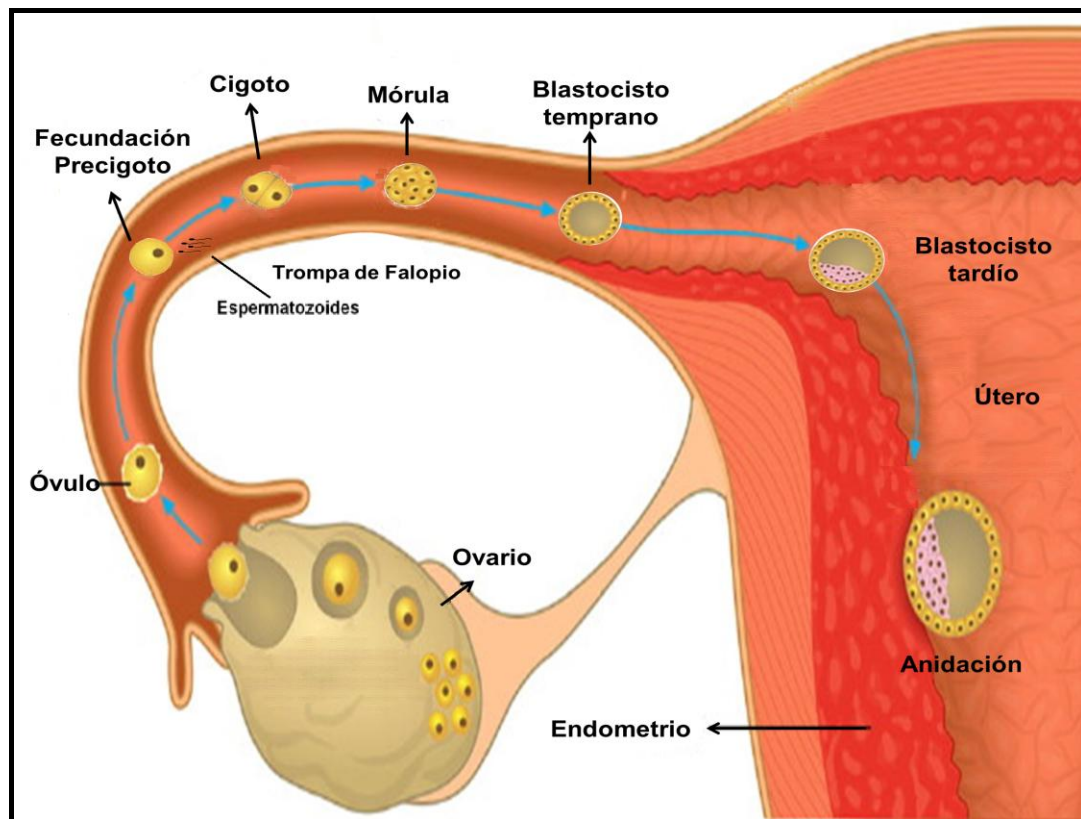
A partir de la constitución del cigoto, en el embrión se producen una serie de rápidas divisiones mitóticas y a este periodo celular se le llama segmentación. Mientras el embrión se segmenta es transportado a lo largo de la trompa de Falopio para entrar en el útero. El embrión en su conjunto no cambia de dimensiones y queda encerrado en la zona pelúcida que le protege y le impide adherirse a paredes tubáricas (Sgreccia y Carrasco, 2006; Arteaga y col., 2007).

La segmentación está acompañada por crecimiento celular y por tanto subdividen al cigoto en células hijas más pequeñas llamadas blastómeros. Esta etapa de segmentación dura de cuatro a cinco días, terminando con la formación de una esfera sólida de células llamada mórula (Sgreccia y Carrasco, 2006; Arteaga y col., 2007; Velázquez, 2009) (**Figura 7**).

Después de la entrada de la mórula en la cavidad uterina, en un estado 8-16 células, está se compacta produciendo profundos cambios metabólicos y estructurales para iniciar la diferenciación celular y formar un blastocisto con una cavidad grande llamada blastocele. El

blastocisto empieza a expresar y transcribir más de 500 genes y es activado para liberarse de la zona pelúcida. En un polo del blastocisto quedan las células formadoras del embrión, también llamado embrioblasto. Uno o dos días después, las células del embrioblasto se reorganizan formando una estructura discoidal con dos capas de células, el epiblasto y el hipoblasto, constituyendo el disco embrionario bilaminar, es en esta etapa que el blastocisto alcanza la cavidad uterina e inicia su implantación en el endometrio (Sgreccia y Carrasco, 2006; Arteaga y col., 2007; Velázquez, 2009) (**Figura 7**).

Si el resultado de la combinación de los genes maternos y paternos es correcto, el desarrollo del nuevo organismo va por buen camino, pero si ocurre algún trastorno en el reparto del material genético durante la maduración de los gametos o en las primeras etapas de segmentación, la situación puede ser grave para el desarrollo subsecuente (Arteaga y col., 2007).



**Figura 7.** Etapas desde la fecundación hasta la implantación del embrión (Tomado y modificado de Corts, 2010).

### **Técnicas de Reproducción Humana Asistida (TRHA)**

En la actualidad, en los países industrializados, se observa aumento en la demanda de los servicios médicos para el estudio y tratamiento de la infertilidad (Jausoro, 2000).

Las Técnicas de Reproducción Humana Asistida (TRHA) sustituyen o complementan el contacto sexual y surgen con el objetivo principal de maximizar las posibilidades de fertilización y de embarazo viable. Su efectividad puede medirse de múltiples maneras: probabilidad de implantación por embrión transferido, probabilidad de embarazo, número de nacimientos y nacido vivo. Estas tecnologías son la opción después del fracaso del tratamiento médico o quirúrgico y están en constante cambio ya que no existe acuerdo sobre los criterios diagnósticos o terapéuticos disponibles (Jausoro, 2000; Rosas, 2007).

En la actualidad se realizan los siguientes tratamientos para los problemas de fertilidad:

**Estimulación ovárica (EO).** Consiste en la administración de diferentes fármacos para estimular el desarrollo óptimo de más de un ovocito y la ovulación en mujeres con desórdenes ovulatorios. Está indicada en mujeres con trastornos ovulatorios, en la infertilidad idiopática, para realizar una superovulación o hiperestimulación ovárica controlada y como ayudante de otras TRHA (Jausoro, 2000; Remohí y col., 2000).

Los fármacos de elección para obtener una respuesta ovárica suprafisiológica son las gonadotropinas. Existen varios tipos de gonadotropinas que pueden utilizarse en diferentes dosis y por distintas vías de administración (Jausoro, 2000).

La medicación debe ser ajustada de forma correcta a su respuesta particular ya que cada mujer responde de forma diferente e incluso a cada ciclo de la misma paciente puede precisar diferentes dosis, también es imprescindible llevar a cabo un control de los ovarios, para conseguir la respuesta óptima (Jausoro, 2000; García y col. 2006).

Es importante un control estricto de las dosis y un seguimiento adecuado, ya que dosis excesivas pueden producir síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS), embarazo múltiple o reacciones alérgicas.

**Inseminación artificial (IA).** Se define como el depósito de espermatozoides de forma no natural en el aparato reproductor femenino con la finalidad de lograr una gestación. Al referirnos a la IA se contemplan una serie de procedimientos: la estimulación del desarrollo folicular múltiple con el objetivo de obtener el mayor número de ovocitos disponibles, pero siempre intentar que sea menor de 3, control de la foliculogénesis para conseguir una sincronización correcta entre el momento de la ovulación y el día de la inseminación y capacitación seminal que permite concentrar la mayor cantidad de espermatozoides móviles (Jausoro, 2000; Remohí y col., 2000; García y col. 2006).

Dependiendo de la procedencia del semen, se puede clasificar en dos grupos (Jausoro, 2000):

1. Inseminación artificial con semen conyugal, de pareja u homóloga.
2. Inseminación artificial con semen de donante o heteróloga.

Dependiendo del lugar de inseminación se habla de inseminación intracervical o intrauterina (IIU). Esta última es la más frecuente debido a su baja complejidad, escaso costo y posibilidades de realizar en la consulta médica del ginecólogo, representa la TRHA más utilizada en el mundo (Jausoro, 2000).

Entre sus inconvenientes destaca que se asocia a una alta tasa de embarazos múltiples, si se acompaña de estimulación ovárica, infecciones pélvicas y reacciones alérgicas. En la literatura se recomienda realizar un máximo de 4 ciclos de tratamiento antes de pasar a las técnicas de alta complejidad (FIV e ICSI) (Jausoro, 2000).

**Fecundación *In Vitro* con Transferencia de Embriones (FIV-TE).** Consiste en la recuperación de ovocitos por aspiración guiada por ultrasonidos para su inseminación *in vitro* con el semen de la pareja o de un donante. El semen puede ser fresco, si procede de la pareja o congelado, si es de donante. Cuando tiene lugar la fertilización los embriones resultantes son transferidos en el día 3 al útero a través del cérvix (FIV-TE) o a las trompas de Falopio (transferencia tubárica) (Jausoro, 2000; Remohí y col., 2000; Galán y col., 2008).

La FIV se instaura como tratamiento de la infertilidad asociada a patología tubárica bilateral, pero tiene muchas más indicaciones, como la esterilidad por factor masculino no grave, los fallos de inseminación artificial (conyugal o de donante), la disfunción ovárica, la endometriosis, la



esterilidad idiopática o cuando han fallado otras técnicas menos invasivas como la IIU (Jausoro, 2000; Galán y col., 2008).

Estos embarazos tienden a ser más complicados que los concebidos de forma natural, se han observado elevadas tasas de embarazos ectópicos, abortos espontáneos y partos prematuros, mayor incidencia de hipertensión inducida por el embarazo, sangrado vaginal que requiere hospitalización, mayor riesgo de parto por cesárea que implica riesgos adicionales y embarazos múltiples (Corabian, 1999; Jausoro, 2000).

**Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).** Consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito que previamente se ha decumulado. Se utiliza en los casos en los que no se puede realizar FIV convencional. Esta técnica permite conseguir fecundación y embarazo en casos en donde se trabaja con muestras seminales de bajo recuento, baja movilidad, disminución del número de espermatozoides con morfología normal o tras fallos de fecundación inexplicados después de FIV, infertilidad inmunitaria, mala calidad ovocitaria, etc. (Albert y col., 2008; Zulategui y col., 2008).

Los pacientes sin espermatozoides en el eyaculado pueden conseguir embarazo usando ICSI con espermatozoides del epidídimo, testicular o con espermátides (Jausoro, 2000).

Esta técnica ha supuesto un avance importante para las parejas infértiles por defectos severos del semen. En estos casos la técnica ICSI da lugar a tasas de fertilización significativamente superiores a la de la FIV convencional sin alteraciones en la calidad embrionaria (Jausoro, 2000).

Tienen los mismo riesgos y complicaciones que los embarazos logrados por la FIV, relacionados con el empleo de la estimulación ovárica, los métodos extracorpóreos empleados durante el tratamiento y los procedimientos para la recuperación de ovocitos y la transferencia de embriones (Jausoro, 2000).

Con el empleo de esta técnica lo más preocupante es el riesgo de transmisión de enfermedades genéticas, por ello, aunque la ICSI se considera un procedimiento seguro, se aconseja realizar un análisis cromosómico en los miembros de estas parejas antes de realizar un procedimiento de este tipo (Jausoro, 2000).

### **De la fecundación al blastocisto en las TRHA**

Para las TRHA el desarrollo embrionario se evalúa *in vitro* por día observando las siguientes características (Mercader y col., 2008):

**Día 0:** Día de la punción.

**Día 1:** Se observa la fecundación (**Figura 8, D1**).

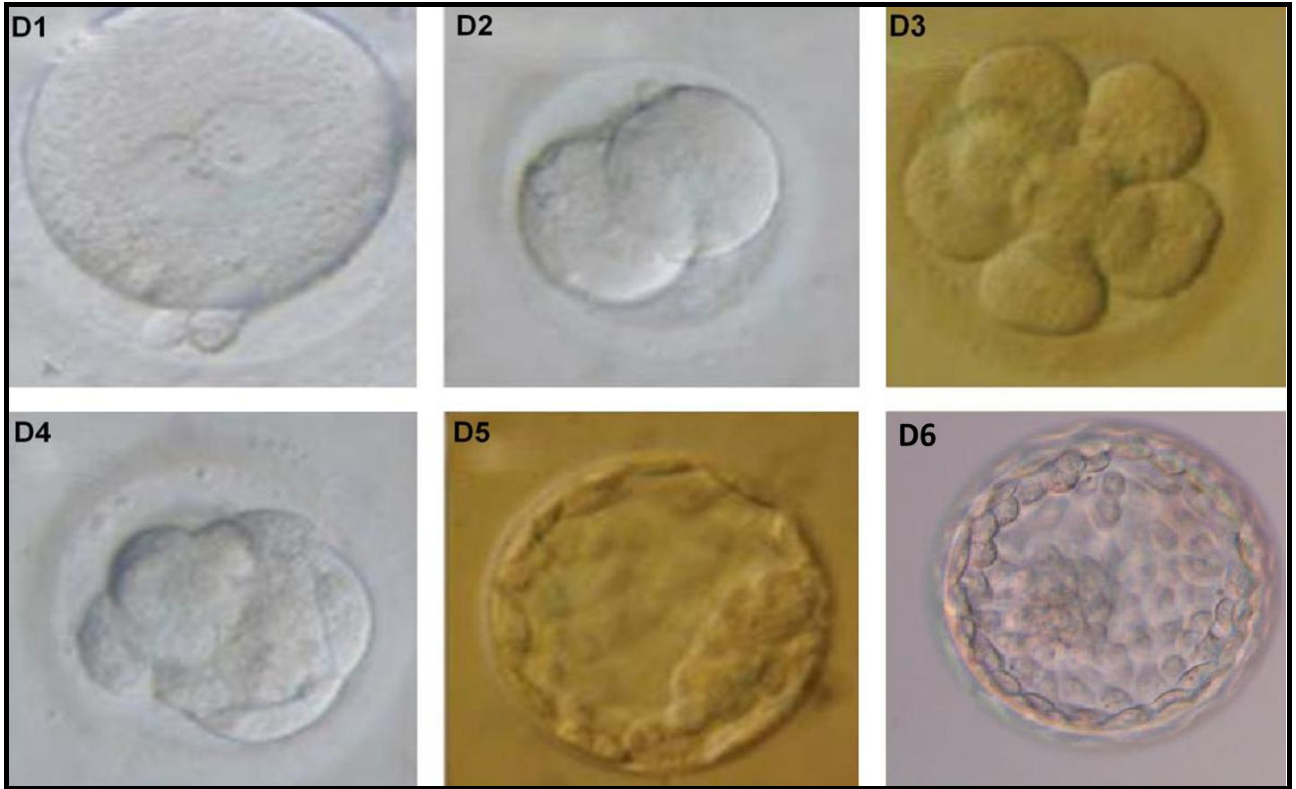
**Día 2:** Se produce la primera división embrionaria. Se pueden observar sobre todo en embriones que tienen dos y cuatro células, aunque en ocasiones el número de células puede ser distinto (**Figura 8, D2**).

**Día 3:** Se observa principalmente embriones que tienen entre seis y ocho blastómeros. Día de transferencia embrionaria (dependiendo de la etiología y criterios médicos) (**Figura 8, D3**).

**Día 4:** Posteriores divisiones dan lugar a un embrión de 16-32 células denominado mórula. A continuación, los blastómeros se van compactando, formando lo que denominamos mórula compacta (**Figura 8, D4**).

**Día 5:** Empieza a formarse una cavidad dominada blastocele y se produce la diferenciación celular. Se puede observar principalmente dos tipos de blastocistos: temprano y cavitado (**Figura 8, D5**).

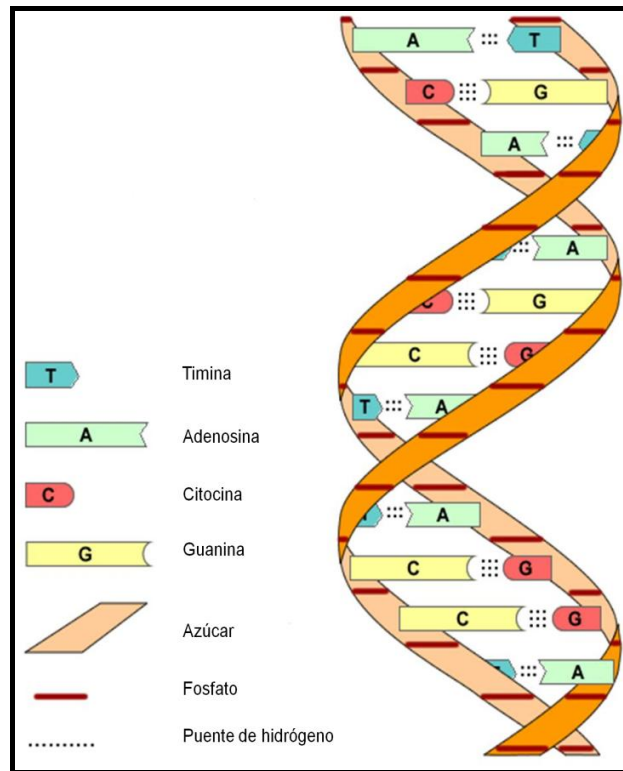
**Día 6:** Día de transferencia embrionaria. El blastocisto está en el estadio expandido, eclosionando (*hatching*) o eclosionado (*hatched*). Se observa el blastocele rodeado por una monocapa celular, o trofoectodermo y la masa celular interna (**Figura 8, D6**).



**Figura 8.** Desarrollo embrionario del Día 1 al Día 5 (Tomada y modificada de Devroey y col., 2009).

## 5. Características del ADN

Básicamente el ADN consiste de una doble hélice con 2 cadenas complementarias, enrolladas conjuntamente alrededor de un eje común, formando una hélice (**Figura 9**). Las dos cadenas se orientan en sentidos opuestos a lo largo de la hélice, una discurrendo en sentido  $5' \rightarrow 3'$  y la otra en sentido  $3' \rightarrow 5'$ . El esqueleto de cada cadena está formado por las moléculas de azúcar alternado con grupos fosfato. Los grupos fosfato están cargados y las moléculas de azúcar contienen grupos hidroxilo polares y, por tanto, no sorprende que el elemento azúcar-fosfato de cada cadena se sitúe hacia el exterior de la hélice del ADN, donde pueden interactuar favorablemente con el medio acuoso circundante. Las bases purícas y pirimídicas, por otra parte, son compuestos aromáticos con menor afinidad por el agua. De acuerdo con esto, se orientan hacia el interior, formando los pares de bases que mantienen unidas a las dos cadenas. Para formar una doble hélice estable, las hebras deben discurrir, no solo en sentidos opuestos, sino también complementaria. Con esto se explica que una base en una hebra puede formar puentes de hidrógeno específicos con la base que se enfrentan a ella en la otra hebra (Becker y col., 2006).



**Figura 9.** Estructura del ADN (Tomado y modificado de Speer-Williams, 2010).

## 6. Fragmentación del ADN

El ADN espermático está organizado de forma tal que mantiene la cromatina compacta y estable. Esta organización de la molécula de ADN no solo permite que se encuentre muy bien empaquetado el material genético para ser transferido al ovocito, sino que asegura que el ADN sea entregado en una forma física y química tal, que contribuya al desarrollo del embrión haciendo más accesible la información genética. El espermatozoide fértil tiene un ADN estable, el cual es capaz de descondensarse en el momento apropiado del proceso de la fertilización y transmitir el ADN sin defectos, sin embargo por diversas causas el ADN empaquetado en la cromatina, puede sufrir fracturas, conocidas como nicks, tanto en la cadena simple como en la doble hélice, fenómeno que recibe el nombre de fragmentación del ADN (Gutiérrez, 2007).

El análisis de las características del semen sigue siendo la prueba clínica de laboratorio más importante que se dispone para la evaluación del factor masculino y es esencial en la valoración de la pareja con dificultades reproductivas. La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) estableció unos parámetros básicos que se deben analizar en el estudio del factor masculino de forma rutinaria; aun así, se estima que aproximadamente un 10 o 15% de los varones estériles presentan parámetros dentro de rangos normales. En estos casos el origen de la esterilidad masculina podría deberse, entre otras causas, a defectos en la membrana del espermatozoide, factores ambientales, genéticos y por tanto no detectables en el seminograma (Morales y col., 2007).

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

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

Se han realizado varios trabajos que evidencian la relación existente entre la integridad del ADN espermático y la fertilidad. Estos trabajos demuestran que los varones infértiles tienen una mayor fracción de espermatozoides con roturas en el ADN, y se ha intentado establecer un punto de corte por encima del cual el pronóstico sería desfavorable (Morales y col., 2007).

### **Mecanismos de fragmentación del ADN en espermatozoides**

En cualquier etapa de la espermatogénesis se puede producir un daño en el ADN espermático (Morales y col., 2007).

El origen de las lesiones en el ADN del espermatozoide puede deberse a múltiples condiciones patológicas como son la presencia de una infección, leucocitospermia, el uso de fármacos, la presencia de fiebre alta, criptorquidia, cáncer, la contaminación atmosférica, el tabaquismo, los varicoceles, los factores hormonales, o una edad avanzada, entre otros. Muchas condiciones ambientales también pueden provocar fragmentación del ADN, tales como quimioterapia, radioterapia, medicina prescrita, la contaminación atmosférica, el tabaquismo, los pesticidas, productos químicos, el calor y los protocolos de preparación de las TRHA (Evenson y Wixon, 2006; Gutiérrez, 2007).

El mecanismo molecular implicado en estas lesiones se encuentra aún bajo intensa investigación, sin embargo se conocen mecanismos que contribuyen de forma notable a incrementar las tasas de daño registrado en el ADN tanto mitocondrial como nuclear del espermatozoide (**Cuadro IV**):

- Fallas en la apoptosis durante el proceso de espermatogénesis.
- Roturas del ADN o “nicks” producidos durante el remodelado de la cromatina que tiene lugar durante el proceso de espermiogénesis.
- Fragmentación del ADN a nivel posttesticular inducida por radicales libres.
- Fragmentación del ADN inducida por caspasas y endonucleasas espermáticas.

**Cuadro IV.** Resumen de los diferentes mecanismos de fragmentación de ADN en espermatozoides.

Mecanismos	Causa	Consecuencia
<b>Fallas en la apoptosis durante el proceso de espermatogénesis</b>	Es un mecanismo de control y regulación en el cual se desenlaza un proceso de selección que determina que sólo los espermatozoides más aptos tengan la oportunidad de sobrevivir y fecundar las células sexuales femeninas (Hernández-Matos y col., 2010).	Los espermatozoides con fragmentación en el ADN son normalmente eliminados durante la espermatogénesis como mecanismo de control, pero pueden persistir en el eyaculado debido a una falla en el proceso de apoptosis, lo que podría resultar en una fecundación con desarrollo embrionario anormal (Gil y col., 2007).
<b>Roturas del ADN o “nicks” producidos durante el remodelado de la cromatina que tiene lugar durante el proceso de espermiogénesis</b>	En el núcleo espermático las histonas encargadas del empaquetamiento de la cromatina son removidas y sustituidas por protaminas. Para que se produzca el empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide, es necesaria la actividad de nucleasas endógenas que corten y ligan el ADN durante su protaminación. Estos cortes proporcionarían una liberación de estrés torsional ayudando así al empaquetamiento de la cromatina durante el desplazamiento de las histonas por las protaminas (Álvarez, 2007; Bouvet y col., 2007; Gil y col., 2007).	Alteraciones en el control de este proceso podrían resultar en roturas del ADN no reparadas. Estas alteraciones se producirían antes de la espermiación, en la compactación subóptima de la cromatina espermática, se han encontrado proporciones alteradas de las protaminas, completa ausencia de las mismas o inapropiada formación de las uniones disulfuro debido a una inadecuada oxidación de tioles en estos residuos protéicos, por lo que el ADN sería más vulnerable al daño (Álvarez, 2007; Gil y col., 2007).
<b>Fragmentación del ADN a nivel posttesticular inducida por radicales libres</b>	La exposición excesiva a especies reactivas de oxígeno (ERO) podría ser una consecuencia de deficiencias en las estrategias antioxidantes que el tracto masculino pone en su lugar para proteger a los espermatozoides de los ataques de los radicales libres, estas especies químicas se producen como consecuencia del metabolismo celular del oxígeno durante procesos fisiológicos o en respuesta a factores exógenos (Hernández-Matos y col., 2010; Aitken y Koppers, 2011).	Las ERO son capaces de dañar el ADN a través del fraccionamiento de cadena sencilla y doble, modificación de bases, producción de sitios libres de base, deleciones, cambios en el marco de lectura, uniones cruzadas, arreglos cromosómicos, oxidación de las bases de purina y pirimidina, así como del esqueleto carbonado. (Gil y col., 2007; Shamsi y col., 2008; Hernández-Matos y col., 2010).
<b>Fragmentación del ADN inducida por caspasas y endonucleasas espermáticas</b>	La apoptosis se logra por la activación de las caspasas. Su estimulación da lugar a las características y cambios morfológicos de las células apoptóticas. Las caspasas apoptóticas iniciadoras son las caspasas 2, 8, 9 y 10, que activan caspasas efectoras 3, 6 y 7 que conduce a la escisión de diversos sustratos y la finalización del proceso de apoptosis (Fuentes-Prior y Salvesen, 2004; Said y col., 2010).	La activación de caspasas y endonucleasas en espermatozoides diferenciados causada por factores fisicoquímicos, puede inducir también fragmentación del ADN espermático. La fragmentación del ADN puede ser causada en parte por la activación de la caspasa-3, que inactiva la polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP), una enzima de reparación del ADN, que posteriormente inhibe la reparación del ADN dañado (Fuentes-Prior y Salvesen, 2004; Grunewald y col., 2009; Said y col., 2010).

Sin embargo, durante el almacenamiento de espermatozoides a bajas temperaturas (criopreservación), también se puede producir fragmentación del ADN. La criopreservación de semen se define como el tratamiento empleado para la conservación y el mantenimiento de los espermatozoides a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  y tiene como objeto el mantenimiento de la viabilidad y función celular a bajas temperaturas (Meseguer y col., 2002).

En este escenario, se ha sugerido que el daño provocado en la molécula del ADN del espermatozoide por razones de distinta naturaleza, puede afectar la salud del embrión, la del feto e incluso la de la descendencia global. Además, se ha propuesto que el efecto de este daño puede asociarse a enfermedades que aparecen en la descendencia, tales como la infertilidad, la posible presencia de cáncer en la niñez o bien puede relacionarse con ciertas enfermedades de impronta genómica anormal (Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

### **Impacto del daño en el ADN espermático y los resultados en las TRHA**

El éxito de las TRHA depende de múltiples factores, y entre ellos la integridad estructural y funcional de los gametos usados. Por ello, la naturaleza de la infertilidad y su causa deberían ser analizadas antes de iniciar el tratamiento (Morales y col., 2007).

En cuanto al gameto masculino y su material genético se ha demostrado que una fracción elevada de espermatozoides con defectos en la cromatina puede tener un impacto negativo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida. Con frecuencia las muestras de semen que muestran altos niveles de daño en el ADN están asociadas a una disminución de las tasas de fertilización o implantación después de FIV/ICSI, y pueden dar lugar a mala calidad embrionaria, bloqueo embrionario o aborto. Aunque en estos procedimientos se seleccionan los espermatozoides de mejor motilidad y morfología, siempre hay un porcentaje de los mismos que contienen varios grados de daño en el ADN y que pueden alcanzar el ovocito con un mínimo o ningún esfuerzo (FIV o ICSI) (Morales y col., 2007).

Diversos autores han correlacionado los valores de fragmentación con los resultados de las TRHA para intentar establecer un punto de corte a partir del cual se pueda predecir el resultado de las mismas. Lograrlo supondría aumentar notablemente las tasas de éxito, reducir el número de ciclos innecesarios y conseguir finalmente una eficiencia mayor de la técnica de reproducción asistida empleada lo que causa no sólo en mayores tasas de embarazo sino también en menor costo socio-económico (Morales y col., 2007).

### **Relación entre fragmentación del ADN espermático y desarrollo embrionario**

Las primeras etapas del desarrollo embrionario están sometidas al control materno y la expresión de los genes paternos comienza en el estadio de 4-8 células; en ese momento las alteraciones del ADN paterno se ponen de manifiesto, perjudicando el desarrollo del embrión y produciendo bloqueo embrionario, que puede explicar ciertos fallos de implantación, embarazos bioquímicos o abortos clínicos (Seli y col., 2004; Morales y col., 2007).

El efecto paterno a veces es aparente ya en el estadio embrionario de pronúcleos (efecto paterno temprano), y se ha sugerido que puede deberse a una deficiencia de factores activadores del ovocito, o a un elevado nivel de fragmentación que pueda exceder la capacidad reparadora del mismo (Tesarik y col., 2002; Morales y col., 2007).

El genoma paterno es transcripcionalmente inactivo hasta dos o tres días después de fertilización. Sin embargo, una vez que el genoma paterno está activo, los resultados son desarrollo pobre de blastocistos, división desigual, fallo en la implantación o pérdida fetal temprana. Pequeños daños del ADN en el espermatozoide son reparados por pre y post-replicación por los mecanismos de reparación materna, pero los daños grandes del ADN no se pueden reparar. Así, aunque los

hombres infértiles pueden tener espermatozoides con morfología normal, estas células germinales pueden tener el ADN dañado. Así, los estudios de la integridad del ADN son de suma importancia en la evaluación de todos los hombres antes de las TRHA (Shamsi y col., 2008).

### **Técnicas de estudio de la fragmentación del ADN espermático**

Los parámetros seminales convencionales no son útiles en los pacientes con esterilidad idiopática (esterilidad inexplicada). Tampoco en las técnicas de reproducción asistida estos parámetros seminales clásicos tienen mayor importancia. Las técnicas de reproducción asistida suponen un salto en los mecanismos de selección espermática natural y permiten incrementar las posibilidades de que un espermatozoide pueda fertilizar un óvulo con material genómico alterado. Las circunstancias cambiantes obligan al desarrollo de procedimientos alternativos que permitan evaluar la calidad espermática del ADN espermático. La mayoría de los estudios muestran una correlación inversa significativa del daño del ADN espermático y el índice de fertilidad (Agarwal y Allamaneni, 2005).

En la actualidad se dispone de distintas técnicas que permiten detectar la presencia de lesiones en el ADN espermático. **Cuadro V.**

**Cuadro V.** Resumen de las metodologías utilizadas para evaluar alteraciones en el ADN de espermatozoides, así como de algunas de sus ventajas e inconvenientes en relación con la aplicación clínica de rutina. TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labeling. ISNT = In situ Nick Translation. SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay. SCD: Sperm Chromatin Dispersion. DBD-FISH: DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization. NA: Naranja de Acridina. AT= Azul de Toluidina. CMA: Cromomicina A3 (Cortés-Gutiérrez v col., 2007).

Método	Instrumental	Ventajas	Desventajas	Utilidad clínica	Fundamento
<b>Metodologías que se basan en el marcaje de roturas del ADN</b>					
<b>TUNEL</b>	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Cumple con parámetros de control de calidad	Equipo sofisticado y costoso (citometro de flujo)	Fertilidad masculina Reproducción asistida Perdida fetal	Permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados con los extremos de las roturas existentes del ADN, bien sea de cadena sencilla o doble.
<b>ISNT</b>	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Reacción de marcaje directo	Equipo sofisticado y costoso (citometro de flujo)	Fertilidad masculina	Se basa en la evaluación de la fragmentación tras la incorporación de moléculas de dUTP modificado con biotina o digoxigenina, o bien marcado directamente el ADN con un fluorocromo conjugado con un nucleótido modificado, tras utilizar la enzima ADN polimerasa I.
<b>Metodologías que se basan en la susceptibilidad del ADN para desnaturalizarse</b>					
<b>SCSA</b>	Citometría de flujo	Punto de corte establecido (30%)	Costoso Recomendada para diferenciar pacientes fértiles	Epidemiológico Infertilidad	Basada en la utilización de la citometría de flujo y en las propiedades metacromáticas de la sustancia fluorescente naranja de acridina.
<b>COMETA</b>	Microscopio Fluorescencia	Bajo costo	Lento de ejecución Requiere observador con experiencia	Fertilidad masculina Reproducción asistida Criopreservación de espermatozoides	El ADN de un núcleo desproteínizado que contenga roturas en sus cadenas de ADN, estará más libre para ser movilizado hacia el polo positivo, cuando éste se someta a un campo eléctrico.
<b>SCD</b>	Microscopio Fluorescencia y campo claro	Análisis simple de resultados Bajo costo	Aún no determinada	Aún no determinada Varicocele?	Consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto.
<b>DBD-FISH</b>	Microscopio Fluorescencia	Revela modificaciones estructurales de la cromatina.	Procedimiento sofisticado y costoso	Aún no determinada	Basado en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas o bien ácidas suaves, de producir desnaturalización en la molécula de ADN utilizando los extremos generados por roturas en las cadenas.
<b>Otros métodos</b>					
<b>NA</b>	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Diferencias significativas en patologías andrológicas	Utilizando las propiedades metacromáticas de la naranja de acridina, algunos investigadores han aplicado el mismo principio que el utilizado en el SCSA para visualizar los espermatozoides con ADN fragmentado empleando microscopía de fluorescencia.
<b>AT</b>	Microscopio campo claro	Método simple y de bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Evaluación de anomalías en la cromatina.	El azul de Toluidina es un colorante nuclear básico que genera reacciones metacromáticas cuando interacciona con la cromatina.
<b>CMA</b>	Microscopio Fluorescencia	Método simple y de bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Evaluación de anomalías en la cromatina.	La Cromomicina A3 es un fluorocromo utilizado en citogenética ya que se ancla específicamente a regiones ricas en guanina-citosina y compete por los mismos lugares en el ADN, que las protaminas.



## **Prueba de dispersión de la cromatina del espermatozoide (SCD: *Sperm Chromatin Dispersion*)**

El ADN del espermatozoide se encuentra unas seis veces más compactado que el del cromosoma mitótico. Este ADN se encuentra organizado en bucles de menor tamaño que los de las células somáticas, anclados a la matriz nuclear. Dichos bucles se compactan por la acción de las protaminas intercaladas, las cuales estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas. Si se rompen los enlaces disulfuro mediante un tratamiento ácido y se usa una solución específica de lisis para extraer proteínas, se produce una descondensación diferencial de la cromatina en aquellos espermatozoides que tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen. Los bucles del ADN se relajan constituyendo halos alrededor de la estructura nuclear central residual, de forma que los espermatozoides con fragmentación no liberan bucles del ADN y no generan un halo de dispersión de la cromatina. Por el contrario los que no están fragmentados dan lugar a grandes halos de dispersión que corresponden a bucles del ADN. Simplemente valorando el tamaño de los halos de dispersión de la cromatina, mediante microscopia tanto de campo claro como de fluorescencia, es posible reconocer la presencia de fragmentación de ADN en los espermatozoides humanos (Fernández y col., 2003; Cortés-Gutiérrez y col., 2007; Morales y col., 2007).

La principal ventaja de esta técnica es que la interpretación de los resultados no requiere la determinación de color, no depende de la intensidad de fluorescencia, no necesita de un equipo complejo o de personal especializado (Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

Los resultados preliminares de esta prueba, muestran una correlación con otras metodologías, tales como el SCSA o el TUNEL. Además existe una versión comercial del producto que facilita su uso en laboratorios básicos. Dado que la SCD es una prueba simple, rápida, precisa y de alta reproductibilidad para el análisis de la fragmentación del ADN espermático y no requerimiento de ningún equipo no convencional, la técnica SCD es potencialmente utilizada como prueba de rutina en el estudio de fragmentación del ADN espermático en los laboratorios básicos de andrología (Fernández y col., 2003; Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

En Europa y EEUU se llevaron a cabo de forma independiente dos amplios estudios sobre la relación entre los resultados de la técnica SCSA y la capacidad fertilizante (Evenson y col., 1999; Spanó y col., 2000). Ambos demostraron que un índice de fragmentación del ADN (DFI: DNA fragmentation index) superior al 30-40% es incompatible con la fertilidad *in vivo*, independientemente de la concentración, motilidad y morfología espermática (Morales y col., 2007).

Evenson y col. en el 2002, usando la técnica de SCSA establecieron cuatro categorías para el potencial fertilizante del espermatozoide según el DFI:

- excelente si  $DFI < 15\%$
- alto si  $DFI 15-24\%$
- bajo si  $DFI 25-30\%$
- muy bajo si  $DFI > 30\%$

Previamente Aravindan y col. en 1997 habían establecido una correlación significativa entre las técnicas SCSA, ensayo cometa y TUNEL para espermatozoides humanos, por tanto los datos obtenidos mediante una técnica se podrían comparar con los obtenidos por las otras dos. Sergerie y col. en el 2005 mediante TUNEL hallaron prácticamente los mismos puntos de corte que Evenson y col. 2002. Para ello midieron la fragmentación del ADN espermático en un grupo de 66 hombres infértiles ( $40,9 \pm 14,3$ ) y 47 hombres fértiles ( $13,1 \pm 7,3$ ), estableciendo un punto de corte del 20%. Chohan y col. en el 2006 llegaron a la misma conclusión comparando un grupo de 60 hombres infértiles con un grupo de 7 donantes mediante las técnicas SCSA, TUNEL y SCD.

La criopreservación se ha asociado a una mayor susceptibilidad de los espermatozoides a la fragmentación del ADN espermático (Dalzell y col., 2004).

En un estudio realizado por Donnelly y col. en el 2001, se encontró que el ADN espermático de hombres fértiles no se ven afectado por la criopreservación, por el contrario, el ADN de los espermatozoides de los hombres infértiles fue significativamente dañado por congelación-descongelación, este estudio se llevo a cabo congelando las muestras con nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se analizó mediante Ensayo Cometa.

Duru y col. en el 2001 obtuvieron mediante un estudio con TUNEL que espermatozoides pre y post congelación no difieren en valores en relación a la fragmentación de ADN.

En el 2006 Gandini y col. con la SCSA indican una relación entre el aumento del DFI y la criopreservación de espermatozoides, estos resultados fueron corroborados con estudio previos realizados con la misma técnica (Spanò y col., 1999) y comparados con otras pruebas como TUNEL (Gorczyka y col., 1993; Sailer y col., 1995; Zini y col., 2001) y ensayo cometa (Anderson y col., 1997; Aravindan y col., 1997; Cordelli y col., 2003).

## **7. Criopreservación de espermatozoides**

La criopreservación de los espermatozoides puede ser de ayuda para cualquier programa de reproducción asistida, sobre todo, por ejemplo, en el caso de espermatozoides criopreservados antes de la quimioterapia o la radioterapia. En general, no existen criterios de selección de muestras para congelación, salvo en el caso de los donantes de semen de los cuales sólo el 15 al 20% son aprobados (Gandini y col., 2006; Edelstein y col., 2008).

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y función celular a temperaturas bajas ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) durante largos periodos de tiempo. Mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil, sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que los espermatozoides son expuestos a estrés físico y químico como son las variaciones extremas en la temperatura (shock de frío y de calor), toxicidad de los crioprotectores, formación de hielo en el medio extra e intracelular, deshidratación celular e incremento en la concentración de solutos (shock osmótico), lo que puede inducir efectos perjudiciales en el espermatozoide como muerte celular (apoptosis), desnaturalización de proteínas por cambios en el pH, daño en la membrana celular, alteraciones en la estructura acrosomal y peroxidación lipídica en la membrana por aumento de las ERO, esto reduce drásticamente la viabilidad, motilidad e integridad del ADN afectando la capacidad fecundante de los espermatozoides lo que se ve reflejado en una baja en la tasa de éxito de la TRHA (Stornelli y col., 2005; Ávila-Portillo y col., 2006; Gandini y col., 2006; Serzedello y col., 2006; Calamera y col., 2008; Campos y col., 2008; Torres y col., 2009).

La apoptosis se ha correlacionado con una disminución en la capacidad de fertilización de los espermatozoides y se ha documentado un aumento de los marcadores de apoptosis en respuesta a la criopreservación y descongelación de espermatozoides humanos. Esto plantea una grave amenaza para las tasas de éxito en el uso de espermatozoides criopreservados en las TRHA (Said y col., 2010).

Algunos estudios han revelado que los marcadores de apoptosis tienden a aumentar en los espermatozoides después de la criopreservación y la descongelación. Martín y col. en el 2004 observaron que después de la criopreservación en los espermatozoides se incrementaron las manifestaciones apoptóticas como son cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, la activación de caspasas, cambios en permeabilidad de la membrana y externalización de fosfatidilserina.

Duru y col. en el 2001 observaron que después de la criopreservación hubo un aumento en el porcentaje de translocaciones de fosfatidilserina en la membrana de espermatozoides en muestras de pacientes y donantes. Paasch y col., 2004 por su parte observaron que la criopreservación fue significativamente asociada con la activación de las caspasas 3, 8 y 9, así como alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo en ambos estudios la fragmentación del ADN en el espermatozoide no fue significativa.

En general, la incidencia de la fragmentación del DNA espermático durante la criopreservación todavía no se dilucida bien. La evidencia actual sugiere que la fragmentación del ADN espermático se asocia más a un aumento del estrés oxidativo durante la criopreservación que la activación de caspasas y la apoptosis (Thomson y col., 2009).

Se ha demostrado que el daño criogénico en la membrana está relacionado a los ERO que inducen daño al axonema de los espermatozoides y el ADN nuclear. La producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) aumenta durante descongelación de espermatozoides lo que podría explicar, en parte, por qué aumenta el daño de ADN después de la descongelación (Calamera y col., 2008).

En un estudio se demostró el aumento rápido en la fragmentación del ADN en el espermatozoide durante las primeras 4 horas después de la descongelación. Por lo tanto, las muestras de semen descongelado deben ser utilizadas en la práctica clínica lo más rápidamente posible (Gosálvez y col., 2009 b).

A pesar del descenso en la capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados, es necesario la criopresevación de las muestras durante un periodo de seis meses tras ser analizadas ya que es una condición para garantizar su uso y evitar el contagio de enfermedades infecciosas a la paciente receptora (Torres y col., 2009).

Es preciso señalar que el proceso de congelación-descongelación es mortal para el 45-50% de los espermatozoides. Por ello, para la congelación es preciso utilizar sustancias y medios que protejan al máximo a los espermatozoides del daño que puedan causar las bajas temperaturas, conocidos como medios crioprotectores. Así mismo las muestras deben ser conservadas en recipientes adecuados para mantenerlas en óptimas condiciones (Campos y col., 2008).

Los diferentes bancos de semen disponen de sus propios protocolos, crioprotectores, medios diluyentes y recipientes de criopreservación para las muestras. Cada uno establece la metodología más conveniente según experiencias y estudios internos con el fin de progresar y mejorar los resultados de su programa de donación (Torres y col., 2009).

## **8. Banco de semen de donantes**

El banco de semen es un servicio integrado en determinados centros de reproducción asistida que permite la criopresevación de muestras de semen y biopsias de testículo para su utilización futura. El servicio puede ocuparse también de almacenamiento y gestión de muestras de semen proporcionadas por donantes (Garrido y Meseguer, 2008).

El banco de semen permite, además, el transporte de las muestras a otras zonas geográficas (muestras valiosas, como las obtenidas antes de tratamientos de quimioterapia, o biopsias) y mejora el aprovechamiento del eyaculado, ya que al congelarse las muestras en píldoras, un único eyaculado o biopsia puede usarse en diferentes ocasiones (Garrido y Meseguer, 2008).

El semen de donante anónimo puede estar destinado a mujeres sin pareja, a parejas en el que el varón presenta una patología seminal grave, incluso con ausencia de espermatozoides, a parejas en las que las técnicas de reproducción asistida han fracasado repetidamente, o en las que el varón es positivo para el VIH, o portadores de alteraciones genéticas todavía no tratables mediante diagnóstico preimplantacional (Garrido y Meseguer, 2008).

Una de las indicaciones para la congelación del semen es evitar el período ventana de enfermedades infecciosas (por ejemplo el VIH), que se comprueban rutinariamente mediante la presencia de anticuerpos en sangre frente al virus. Dado que estos sólo son detectables en suero seis meses después del contacto con la enfermedad, las muestras de semen de donante deben ser almacenadas durante ese período antes de realizar la comprobación serológica y poder utilizarla con seguridad (Garrido y Meseguer, 2008).

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hoy en día para las parejas con problemas de infertilidad existe la posibilidad de utilizar semen de donante por lo que la criopreservación de espermatozoides se considera una alternativa para cualquier programa de reproducción asistida. Los bancos de semen utilizan espermatozoides de óptima calidad para conseguir embarazos viables, sin embargo, en años recientes se ha mostrado que el proceso de congelación-descongelación de los espermatozoides en las técnicas de criopreservación está asociado con un incremento en los niveles de fragmentación del ADN espermático.

La fragmentación del ADN espermático tiene un interés evidente dado que la transferencia de la molécula del ADN íntegra e intacta del espermatozoide al óvulo, es esencial para conseguir la fertilización y desarrollo embrionario normal. Al utilizar técnicas de reproducción asistida se eliminan las barreras de selección natural que ocurren de forma normal desde la eyaculación hasta que el espermatozoide más apto alcanza y fecunda al óvulo. Se ha propuesto que el daño sobre la molécula del ADN del espermatozoide puede afectar la salud del embrión o la del feto, de ahí el interés en desarrollar técnicas analíticas encaminadas a medir la fragmentación del ADN espermático, e incluirlas en el estudio del factor masculino.

Es por ello que se evaluó el grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides de donantes del banco de semen, así como la capacidad de fertilización en los procedimientos de reproducción asistida de alta complejidad (FIV e ICSI), con el fin de obtener más información que permita una mayor probabilidad de embarazos en aquellas parejas que requieran el uso de banco de semen como alternativa, así como aportar información adicional acerca de la calidad de los espermatozoides provenientes de banco de semen.

## **V. HIPÓTESIS**

Las muestras de donantes de banco de semen presentan una mejor calidad espermática, sin embargo, al ser sometidas al proceso de criopreservación se presentará un incremento en la fragmentación del ADN espermático evento que posiblemente afectará la capacidad de fertilización de los espermatozoides y el posterior desarrollo embrionario.

## **VI. OBJETIVOS**

- Determinar el índice de fragmentación del ADN espermático en fresco y post descongelación de las muestras de donantes de banco de semen.
- Analizar si existe una relación entre los parámetros seminales y el índice de fragmentación del ADN espermático de las muestras de donantes de banco de semen en fresco y post descongelación.
- Analizar la posible relación entre el grado de fragmentación del ADN espermático y la capacidad de fertilización de los espermatozoides de donantes de banco de semen en óvulos de pacientes y su posterior desarrollo embrionario utilizando las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (FIV e ICSI).

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se analizaron 968 muestras seminales de 44 donantes de banco de semen (IVI, México), a cada una de las muestras se les evaluó los parámetros seminales en fresco y descongelado y para evaluar la integridad de la cromatina se obtuvo el Índice de Fragmentación del ADN espermático de las 44 muestras tanto en fresco como en descongelado.

### **a) Colecta de la muestra**

Las muestras se tomaron con un tiempo de abstinencia sexual de 48 a 72 horas, se colectaron por masturbación directamente en un envase de plástico estéril (etiquetados con los datos del donante). Una vez tomada la muestra, ésta se mantuvo a una temperatura de 37°C para evitar una reducción en la movilidad hasta su análisis.

### **b) Seminograma**

#### **Examen macroscópico**

##### **Licuefacción y viscosidad**

Si transcurridos 60 minutos la muestra no completó la licuefacción, se procedió de la siguiente manera: el semen se licuo mecánicamente, haciéndolo pasar por una pipeta las veces que sea necesario.

La viscosidad se evaluó mediante una aspiración suave en una pipeta y observando el modo en que el semen gotea por efecto de la gravedad. La viscosidad fue normal si el semen cayó gota a gota. Para romper la viscosidad se procedió de la misma manera que para licuar la muestra.

##### **Aspecto**

El aspecto del semen se valoró por su color (blanquecino amarillento), opacidad/transparencia y presencia de cuerpos mucosos o gelatinosos.

##### **Volumen**

El volumen del semen se midió con pipeta graduada.

##### **pH**

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

#### **Examen microscópico**

##### **Preparación de la muestra**

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

##### **Concentración**

Se utilizó una cámara Mackler (Sefi Medical Instrument; Haifa, Israel) que consta de una cuadrícula de 1 mm<sup>2</sup> dividida en 100 cuadros, con una profundidad de 10 µl. Se contaron tres cuadros al azar, se multiplicó por 10 y se dividió entre 3. Estos cuadros corresponden a una concentración de millones /ml a 40X.



## **Movilidad**

El análisis de movilidad de los espermatozoides de la muestra de semen se realizó con cámara Mackler bajo el microscopio de contraste de fases con un objetivo de 40X. Se contaron 100 espermatozoides libres. Nunca los que están agregados entre sí o con otras células. Primero se registraron los espermatozoides móviles progresivos, a continuación se contaron los móviles no progresivos y los inmóviles.

## **Vitalidad espermática**

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

## **Morfología espermática**

Las características morfológicas se evaluaron en extensiones teñidas con Hemacolor (Merck; Darmstadt, Alemania). Se preparó una extensión con 5 µl de semen y se dejó secar. Posteriormente se utilizó la solución fijadora (metanol al 50%) durante 10 segundos seguido de los colorantes eosina durante 45 segundos y hematoxilina 1 minuto para teñir las estructuras del espermatozoide. Finalmente se lavó en agua corriente. Se dejó secar a temperatura ambiente. Se contaron 100 espermatozoides con un objetivo de 100X y aceite de inmersión. Se utilizaron los criterios estrictos de Kruger para la evaluación indicados en el Manual de la OMS.

## **c) Criopreservación del semen en píldoras**

Tras la colecta, se dejó de 30 a 45 minutos hasta su completa licuefacción. La muestra se concentró centrifugando a 2000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante hasta dejar el botón celular diluido en un volumen de plasma de aproximadamente 1 ml.

Se añadió un crioprotector penetrante y no penetrante TYB (Irvine Scientific; California, EUA), previamente atemperado, en proporción 1:1. A continuación se dejó a temperatura ambiente durante 25 minutos para posteriormente proceder a la congelación. Este tiempo se empleó en la rotulación o identificación del recipiente donde se conserva la muestra de semen.

En primer lugar sobre el hielo seco se excavaron unos pequeños pocillos. A continuación, con ayuda de una pipeta Pasteur (esmerilada), se depositaron pequeñas cantidades de la mezcla semen-crioprotector sobre los pocillos.

Cuando las gotas perdieron brillo y adquirieron un color perla opalescente estuvieron listas para depositarlas dentro del criótubo/gobelete, previamente introducido en un recipiente con nitrógeno líquido. El tubo, perfectamente identificado, se introdujo directamente en el tanque de nitrógeno líquido a -196 °C donde se almacenó hasta el momento de la descongelación.

## **Descongelación**

Se transfirieron las píldoras a un tubo de base redonda que se colocó en agua durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se mantuvo en la incubadora a 37 °C durante 10 minutos. Se realizó el recuento de la muestra y se preparó para procedimiento de análisis de fragmentación.

#### d) Recuperación espermática

La recuperación espermática consistió en seleccionar aquellos espermatozoides con mejor movilidad mediante la eliminación del plasma seminal y los espermatozoides inmóviles, junto con las células inmaduras y detritos.

Para la recuperación espermática se utilizaron las técnicas de *swin-up* y gradientes de densidad.

El principio de ***swin-up*** se basa en que sólo los espermatozoides con buena movilidad podrán ascender a la superficie.

Para la técnica de *swin-up* se lavó el semen con medio de cultivo HTF (In Vitro Care; Frederick, MD, EUA) en una relación 1:1 por centrifugación a 400 rpm durante 10 minutos. Después se decantó el sobrenadante y se añadió el medio HTF al sedimento resultante haciéndolo resbalar lentamente por la pared del tubo, para evitar que se mezcle. El volumen añadido dependió de la calidad de la muestra, pudiendo variar desde 0.5 hasta 1.5 ml. Se colocó el tubo en el incubador a 37 °C con 45° de inclinación durante el tiempo estimado según la calidad de la muestra, en él los espermatozoides móviles migran desde el sedimento al medio de cultivo. El momento óptimo de sacar la muestra del incubador fue cuando se observó un cambio de color en el medio, lo que indica que ya es suficiente el número de espermatozoides móviles que han ascendido (30 minutos) después se recuperaron de 0.3 a 0.5 ml de la superficie del sobrenadante que contenía los espermatozoides móviles y finalmente se evaluó de nuevo la muestra capacitada o dejándolo en el incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, hasta su utilización.

El fundamento de los **gradientes de densidad** se basa en la selección de los espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presenta el sistema de gradientes de densidad a diferentes porcentajes y llegar al fondo del tubo, además de actuar como filtro para el plasma seminal, células redondas y aquellos espermatozoides con movilidad no progresiva.

Se prepararon gradientes de 45, 75 y 90%.

Gradiente de 45%: Se mezclaron 4.5 partes de solución PureSperm®100 (Nidacon; Goteborg, Suecia) con 5.5 partes de medio HTF.

Gradiente de 75%: Se preparó mezclando 7.5 partes de solución PureSperm®100 con 2.5 partes de medio HTF.

Gradiente de 90%: Se mezclaron 9 partes de solución PureSperm®100 con 1 parte de medio HTF.

La variación del volumen de cada uno de los gradientes, dependió de la cantidad de espermatozoides inmóviles y detritos en la muestra.

En la técnica de gradientes de densidad primero se deslizó un volumen determinado de gradiente al 90% impregnando las paredes hasta el fondo de un tubo cónico en posición de 45°, a continuación, se depositó el mismo volumen determinado de gradiente al 75% y después el gradiente al 45%, los cuales se dejaron caer de la misma manera que el anterior para evitar que se mezclaran y se rompiera la interfase entre ellos (el volumen de los gradientes y del semen dependió de la concentración y movilidad de la muestra, pudiendo variar desde 0.5 hasta 1.5 ml), después se depositó el mismo volumen de semen haciéndolo también deslizar por la pared del tubo, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos y posteriormente, con una pipeta Pasteur, se recuperó el sedimento, que fue lavado en otro tubo con medio de cultivo (G-Sperm plus/G-Fert plus) a 800 rpm durante 5 minutos después se eliminó el sobrenadante y resuspendió el botón con un volumen de 0.3-0.5 ml de medio (G-Sperm plus/G-Fert plus), previamente se evaluó la muestra y se dejó en la incubadora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, hasta su utilización.

## **e) Técnica de dispersión de la cromatina espermática**

Para analizar la fragmentación del ADN de los espermatozoides de donante se utilizó el equipo Halosperm® (Halotech Dna; Madrid, España). El cual incluye portaobjetos pretratados con agarosa, tubos cónicos de 0.5 ml (Eppendorf) con agarosa de bajo punto de fusión, solución desnaturalizante y solución de lisis.

- Inclusión de la muestra en micrógel de agarosa

Se tomó un frasco con solución de lisis a temperatura ambiente (22 °C). La muestra de semen se diluyó en medio de cultivo o PBS, a una concentración de 5-10 millones/ml. El tubo Eppendorf de agarosa con bajo punto de fusión se introdujo en un flotador y se dejó al nivel de la tapa, se mantuvo durante 5 minutos en agua a 90-100 °C, hasta que la agarosa se disolvió. Se transfirió el tubo con el flotador a un baño a 37 °C, y se dejó 5 minutos hasta equilibrar la temperatura. Se añadieron 60 µl de la muestra de semen al contenido del tubo con agarosa y se resuspendió. Un portaobjetos pretratado con agarosa se colocó en una superficie fría, a 4 °C (por ejemplo, una lámina metálica o de vidrio). Una vez enfriado el portaobjetos, se depositó la suspensión celular del tubo de agarosa sobre la cara tratada del portaobjetos, se colocó un cubreobjetos de cristal, evitando formar burbujas de aire. Se colocó una gota de 14, 20 ó 50 µl, para un cubreobjetos de 18x18 mm, 22x22 mm, o 24x60 mm, respectivamente. A lo largo de todo el proceso, el portaobjetos se mantuvo en posición horizontal. Se introdujo la lámina fría con el portaobjetos, en la nevera y se dejó gelificar la muestra durante 5 minutos.

- Procesado de la muestra

Se preparó la solución desnaturalizante mientras se congeló la muestra. Para ello, se añadieron 80 µl de ácido desnaturalizante en 10 ml de agua destilada, se mezcló y depositó en una caja de incubación. Se retiró el cubreobjetos, deslizándolo con suavidad y se introdujo inmediatamente el portaobjetos, en posición horizontal, en la solución desnaturalizante para dejar incubando durante 7 minutos, a temperatura ambiente (22 °C). Usando guantes, se levantó el portaobjetos con ayuda de una lanceta. Se depositó también en horizontal, en una caja de incubación conteniendo 10 ml de solución de lisis, dejándolo incubar durante 25 minutos. Se levantó el portaobjetos y se introdujo en horizontal en una caja llena de agua destilada para lavar la solución de lisis; con un tiempo de incubación de 5 minutos. Posteriormente se introdujo el portaobjetos, en horizontal, en una caja con etanol al 70% (2 minutos), luego en etanol al 90% (2 minutos) y finalmente en etanol al 100% (2 minutos). Se dejó secar al aire. Una vez secos los portaobjetos se guardaron.

- Tinción de la muestra

Se mezcló solución de Wright (Merck; Darmstadt, Alemania) con solución tampón fosfato (1:1) pH 6.68 (Merck; Darmstadt, Alemania), y se depositó una capa de colorante, en horizontal, que cubrió el micrógel seco. Se dejó tiñendo durante 5-10 minutos, para posteriormente ser decantado y lavado suavemente con agua corriente y se dejó secar.

### **Análisis visual directo**

El nucleóide, que corresponde al núcleo masivamente desproteínizado del espermatozoide, se compone de dos partes: silueta del núcleo del espermatozoide, denominada core, en posición central, y un halo periférico de dispersión de la cromatina/ADN. La cola del espermatozoide es visible.

Se contaron 500 espermatozoides en microscopio de campo claro con objetivo de inmersión y se calculó el porcentaje de la siguiente manera:

$$\text{SCD (\%)} = 100 \times \frac{\text{No. de espermatozoides con ADN fragmentado}}{\text{No. de espermatozoides estudiados}}$$

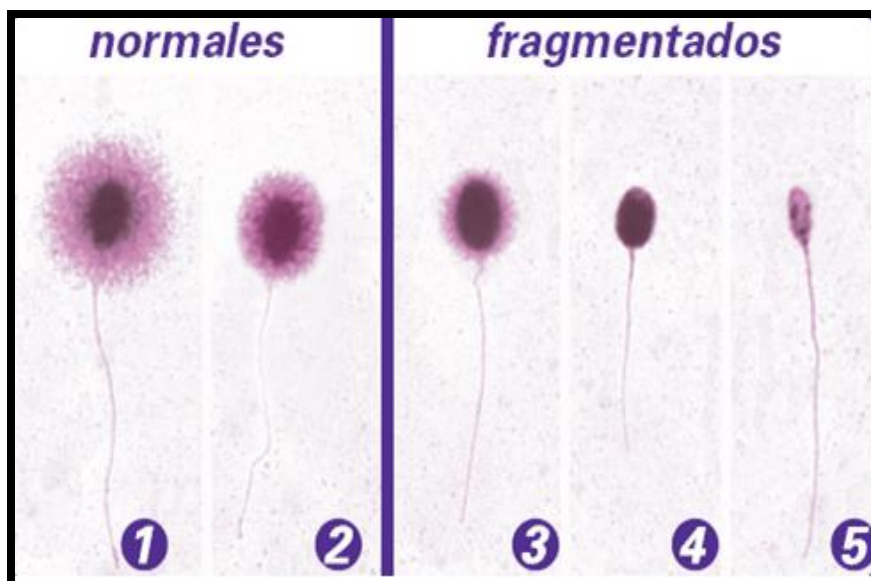
El conteo se realizó adoptando los siguientes criterios básicos:

### Espermatozoides normales

1. Espermatozoides con halo grande: espermatozoides cuyo grosor del halo es igual o mayor a la longitud del diámetro menor del core (**Figura 12, 1**).
2. Espermatozoides con halo mediano: el grosor del halo está comprendido entre: mayor que 1/3 del diámetro menor del core y menor que el diámetro menor del core (**Figura 12, 2**).

### Espermatozoides con ADN fragmentado

3. Espermatozoides con halo pequeño: el grosor del halo es igual o menor que 1/3 del diámetro menor del core, pudiendo ser de forma irregular o prácticamente inapreciable (**Figura 12, 3**).
4. Espermatozoides sin halo (**Figura 12, 4**).
5. Espermatozoides sin halo y degradados: aquellos que sin mostrar halo, presentan el core fragmentado en gránulos o muestran una tinción muy débil (**Figura 12, 5**).
6. "Otros": núcleos de células que no corresponden a espermatozoides.



**Figura 10.** Espermatozoides con ADN no fragmentado y fragmentado 1) halo grande, 2) halo mediano, 3) halo pequeño, 4) sin halo, 5) degradado (Halosperm®, 2005).

### **Análisis de la capacidad de fertilización de los espermatozoides de donantes de banco de semen en óvulos de pacientes y su posterior desarrollo embrionario**

Los resultados de los procedimientos FIV e ICSI en fertilización y desarrollo embrionario con muestras de donantes de banco de semen se consultaron en el archivo del IVI, México con permiso del director del laboratorio de andrología, Pedro Cuapio Padilla. A partir de este archivo se elaboró una base de datos con la que se trabajó.

### **Análisis estadístico de resultados**

Los datos obtenidos en este estudio fueron analizados por la prueba no paramétrica de Wilcoxon para la evaluación de muestras pareadas y las correlaciones fueron establecidas mediante el coeficiente de correlación de Spearman, con un valor de significancia de  $p < 0.05$ . Se utilizó el paquete estadístico SPSS Statistics 17.0.

## VIII. RESULTADOS

### Grupos de Estudio

Se contó con 968 muestras de 44 donantes de banco de semen del IVI, México, las muestras de semen fueron analizadas mediante seminograma (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Análisis seminal. Los parámetros de concentración y movilidad se evaluaron en muestras de semen en fresco y post descongelado. Media  $\pm$  D.E. de las 968 muestras analizadas.

Parámetros	Fresco (media $\pm$ D.E.)	Post descongelado (media $\pm$ D.E.)
Concentración (mill/ml)	134.4 $\pm$ 48.88	87.4 $\pm$ 29.69*
Movilidad		
a	1 $\pm$ 0.29	0 $\pm$ 0
b	60 $\pm$ 6.38	45 $\pm$ 7.62*
c	13 $\pm$ 3.29	14 $\pm$ 3.78*
d	26 $\pm$ 6.37	41 $\pm$ 8.50*

\*  $p < 0.05$  fresco vs post descongelado, Wilcoxon.

Para analizar la integridad de la cromatina espermática de los 44 donantes de banco de semen se obtuvo el Índice de Fragmentación del ADN espermático (DFI) en semen fresco y post descongelado.

En la **Tabla 2** se observa el DFI espermático tanto en semen fresco como en post descongelado de las 44 muestras de donantes de banco de semen, de tal manera que se observan muestras con un potencial de fertilización excelente, alto, bajo y muy bajo.

**Tabla 2.** Número de muestras obtenidas y grado de fragmentación espermática evaluadas en semen fresco y post descongelado, expresadas en porcentajes.

Potencial de fertilización	Excelente		Alto		Bajo		Muy bajo		Total de muestras
	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	
Fresco (%)	5.2	43 (97.7)	16.3	1 (2.2)	0	0 (0)	0	0 (0)	44 (100)
Post descongelado (%)	8.8	38 (86.3)	20.0	5 (11.3)	28.9	1 (2.2)	0	0 (0)	44 (100)

De acuerdo con Evenson y col. en 1999, la correlación dependiendo del grado de fragmentación y potencial fertilizante es: excelente si DFI < 15%, alto si DFI 15-24%, bajo si DFI 25-30%, muy bajo si DFI > 30%.

Estas observaciones se ven reforzadas al establecer correlaciones entre los parámetros seminales de concentración y movilidad tipo a, b, c y d con el DFI espermático de semen en fresco y post descongelado (**Tabla 3 a, b**).

En la **Tabla 3 (b)** se observa una correlación entre el DFI espermático y la movilidad tipo c en muestras de semen post descongelado.

**Tabla 3. (a)** Índice de correlación ( $r$ ) entre el DFI espermático de semen y los parámetros seminales de concentración y movilidad tipo a, b, c y d en fresco. **(b)** Índice de correlación ( $r$ ) entre el DFI espermático de semen y los parámetros seminales de concentración y movilidad tipo a, b, c y d en post descongelado.

a)	Parámetros seminales fresco		DFI fresco		b)	Parámetros seminales post descongelados		DFI post descongelado	
		$r$	$p$			$r$	$p$		
	Concentración	-0.12	0.59		Concentración	-0.02	0.93		
	Movilidad				Movilidad				
	a	0.20	0.36		a	-0.16	0.46		
	b	-0.18	0.41		b	-0.14	0.51		
	c	0.10	0.63		c	<b>-0.47*</b>	<b>0.02</b>		
	d	0.15	0.49		d	0.33	0.11		

\*  $p < 0.05$

\*  $p < 0.05$

Para evaluar el desarrollo embrionario de los óvulos fecundados de pacientes y de donantes con espermatozoides de banco de semen se revisó la base de datos del IVI, México, del 2007 al 2010.

En la **Tabla 4** se muestra el número de procedimientos por cada técnica de reproducción humana asistida (TRHA) de alta complejidad. Con óvulos de pacientes con fecundación *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmica de espermatozoides (ICSI) y con óvulos de donantes fecundación *in vitro* e inyección intracitoplasmica de espermatozoides (OVODON/FIV/ICSI) e inyección intracitoplasmica de espermatozoides (OVODON/ICSI).

**Tabla 4.** Número total de procedimientos por TRHA de alta complejidad.

TRHA	FIV	ICSI	Total	OVODON/FIV/ICSI	OVODON/ICSI	Total
No. de procedimientos	352	440	792	391	157	548
(%)	(44.4)	(55.5)	(100)	(71.3)	(28.6)	(100)

En la **Tabla 5** se observa el número de óvulos por TRHA a los cuales se les evaluó fecundación contando 2 corpúsculos polares (CP) y 2 pronúcleos (PN) en el D1. El desarrollo embrionario se evaluó posteriormente al observar embriones que a partir del D2 presentaran 4 células, en el D3 embriones que presentaran 8 células, en el D5 blastocistos tempranos (BT) y blastocistos cavitados (BC) y en el D6 blastocistos expandidos (BE) y blastocistos en eclosión (BHi).

**Tabla 5.** Número total de óvulos fecundados y con desarrollo embrionario, expresado en porcentajes.

TRHA	Total de óvulos Mill	Fecundación CP	Fecundación PN	D2 células	D3 células	D5 células	D6 células
FIV	352	288	275	125	71	4	3
(%)	(100)	(81.81)	(78.11)	(35.50)	(20.16)	(1.13)	(0.84)
ICSI	440	376	351	168	76	21	11
(%)	(100)	(85.45)	(79.76)	(38.17)	(17.26)	(4.76)	(2.49)
OVODON/ FIV/ICSI	391	342	321	167	109	19	10
(%)	(100)	(87.46)	(82.08)	(42.67)	(27.85)	(4.85)	(2.55)
OVODON/ ICSI	157	150	132	91	48	10	2
(%)	(100)	(95.54)	(84.07)	(57.95)	(30.56)	(6.36)	(1.27)
TOTAL	1340	1156	1079	551	304	54	26
(%)	(100)	(86.26)	(80.51)	(41.11)	(22.68)	(4.02)	(1.93)

Después de obtener los resultados correspondientes a cada TRHA con óvulos de pacientes y óvulos de donantes respecto a la fecundación y desarrollo embrionario se realizó una correlación con el DFI espermático de semen post descongelado mediante la cual se obtuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 6 (a, b)**.

Solo se observó en ICSI correlación entre el DFI espermático post descongelado y desarrollo embrionario en el D5 (**Tabla 6, a**).



**Tabla 6. (a)** Índice de correlación ( $r$ ) entre el DFI espermático de semen post descongelado y las TRHA en fecundación y desarrollo embrionario con óvulos de pacientes. **(b)** Índice de correlación ( $r$ ) entre el DFI espermático de semen post descongelado y las TRHA en fecundación y desarrollo embrionario con óvulos de donantes.

a)

	DFI post descongelado			
	FIV		ICSI	
	$r$	$p$	$r$	$p$
<b>FECUNDACIÓN</b>				
Total de óvulos MII	0.257	0.356	-0.360	0.227
Corpúsculo polar	-0.165	0.556	0.010	0.975
Pronúcleos	-0.282	0.309	0.021	0.947
<b>DESARROLLO EMBRIONARIO EN DÍAS</b>				
D2	-0.251	0.368	-0.099	0.747
D3	0	1	-0.144	0.638
D5	0.260	0.349	<b>-0.572*</b>	<b>0.041</b>
D6	0.062	0.826	-0.116	0.706

\*  $p < 0.05$

b)

	DFI post descongelado			
	OVODON/FIV/ICSI		OVODON/ICSI	
	$r$	$p$	$r$	$p$
<b>FECUNDACIÓN</b>				
Total de óvulos MII	-0.110	0.763		
Corpúsculo polar	-0.354	0.316	-0.447	0.450
Pronúcleos	-0.274	0.443	-0.100	0.873
<b>DESARROLLO EMBRIONARIO EN DÍAS</b>				
D2	0.365	0.300	-0.700	0.188
D3	0.226	0.531	0.500	0.391
D5	-0.271	0.450	0.051	0.935
D6	-0.165	0.650	-0.707	0.182

\*  $p < 0.05$

En la **Tabla 7** se presentan los datos del número de betas positivas, betas negativas y las no transferencia de embriones.

**Tabla 7.** Número total de betas positivas, betas negativas y no transferencia de embriones (NT), expresado en porcentajes.

TRHA	Betas +	Betas-	NT	Total
FIV	14	10	6	30
(%)	(26.42)	(17.86)	(27.27)	(22.90)
ICSI	15	29	14	58
(%)	(28.30)	(51.79)	(63.64)	(44.27)
OVODON/FIV/ICSI	16	9	2	27
(%)	(30.19)	(16.07)	(9.09)	(20.61)
OVODON/ICSI	8	8	0	16
(%)	(15.09)	(14.29)	(0)	(12.21)
TOTAL	53	56	22	131
(%)	(100)	(100)	(100)	(100)

En la **Tabla 8 (a, b)** los datos nos indican las correlaciones que se establecieron entre las TRHA (óvulos de pacientes y óvulos de donantes) y el DFI espermático de semen post descongelado, evaluando en este caso el número de betas positivas, betas negativas y las no transferencias de embriones.

Sólo se observó en FIV una correlación negativa y significativa entre el DFI espermático de semen en post descongelado y betas positivas (**Tabla 8, a**).

**Tabla 8. (a)** Índice de correlación ( $r$ ) entre el DFI espermático de semen post descongelado y número de betas positivas, betas negativas y no transferencia de embriones con óvulos de pacientes. **(b)** Índice de correlación ( $r$ ) entre el DFI espermático de semen post descongelado y número de betas positivas, betas negativas y no transferencia de embriones con óvulos de donantes.

a)

	DFI post descongelado			
	FIV		ICSI	
	$r$	$p$	$r$	$p$
Betas +	<b>-0.568*</b>	<b>0.027</b>	0.009	0.977
Betas -	0.255	0.360	-0.450	0.123
NT	0.405	0.135	0.433	0.139

\*  $p < 0.05$

b)

	DFI post descongelado			
	OVODON/FIV/ICSI		OVODON/ICSI	
	$r$	$p$	$r$	$p$
Betas +	0.297	0.405	-0.783	0.118
Betas -	-0.254	0.479	0	1
NT	0	1		

\*  $p < 0.05$

En la **Tabla 9** se presenta el número de betas positivas, abortos y embarazos bioquímicos que se presentaron y el total de betas positivas que llegaron a término con óvulos de pacientes y óvulos de donantes.

**Tabla 9.** Número de betas positivas, abortos, embarazos bioquímicos y las betas positivas que llegaron a término, expresado en porcentajes.

TRHA	Betas +	Aborto	Bioquímico	Total
FIV	14	2	1	11
(%)	(100)	(14.28)	(7.14)	(78.57)
ICSI	15	5	2	8
(%)	(100)	(33.33)	(13.33)	(53.33)
OVODON/FIV/ICSI	16	7	2	7
(%)	(100)	(43.75)	(12.5)	(43.75)
OVODON/ICSI	8	2	0	6
(%)	(100)	(25)	(0)	(75)
TOTAL	53	16	5	32
(%)	(100)	(30.18)	(9.43)	(60.37)

Los datos de la **Tabla 9** se correlacionaron con el DFI espermático de semen post descongelado. Con óvulos de pacientes en FIV se observa correlación entre el DFI espermático de semen post descongelado y betas positivas (**Tabla 10, a**) mientras que con óvulos de donantes en OVODON/ICSI se observa correlación entre el DFI espermático de semen post descongelado y betas positivas (**Tabla 10, b**).

**Tabla 10. (a)** Índice de correlación ( $r$ ) entre el DFI espermático de semen post descongelado y el número de betas positivas, abortos y embarazos bioquímicos con óvulos de pacientes. **(b)** Índice de correlación ( $r$ ) entre el DFI espermático de semen post descongelado y el número de betas positivas, abortos y embarazos bioquímicos con óvulos de donantes.

a)	DFI descongelado			
	FIV		ICSI	
	$r$	$p$	$r$	$p$
Betas +	<b>-0.621*</b>	<b>0.013</b>	0.116	0.705
Aborto	0.062	0.826	0.136	0.658
Embarazo bioquímico	-0.186	0.507	-0.116	0.706

\*  $p < 0.05$

b)	DFI descongelado			
	OVODON/FIV/ICSI		OVODON/ICSI	
	$r$	$p$	$r$	$p$
Betas +	-0.189	0.601	<b>-0.894*</b>	<b>0.041</b>
Aborto	0.150	0.680	0.447	0.450
Embarazo bioquímico	0.501	0.140		

\*  $p < 0.05$

Finalmente en la **Tabla 11** se presenta el número de recién nacidos vivos, producto único (RNV) y producto gemelar (RNV 2) con óvulos de pacientes y con óvulos de donantes.

**Tabla 11.** Número de recién nacidos vivos, producto único (RNV) y producto gemelar (RNV 2) a partir de las betas positivas, expresado en porcentajes.

TRHA	Betas +	RNV	RNV 2
FIV	11	7	4
(%)	(34.38)	(43.75)	(25)
ICSI	8	6	2
(%)	(25)	(37.50)	(12.50)
OVODON/FIV/ICSI	7	1	6
(%)	(21.88)	(6.25)	(37.50)
OVODON/ICSI	6	2	4
(%)	(18.75)	(12.50)	(25)
TOTAL	32	16	16
(%)	(100)	(100)	(100)

Los datos de la Tabla 11 se correlacionaron con el DFI de semen post descongelado y los resultados se observan en la **Tabla 12 (a, b)**.

Con óvulos de pacientes en FIV hubo correlación entre el DFI de semen post descongelado y el número de betas positivas que llegaron a término.

**Tabla 12. (a)** Índice de correlación ( $r$ ) entre el DFI de semen post descongelado y número de betas positivas que llegaron a término, recién nacidos vivos producto único (RNV) y recién nacidos vivos producto gemelar (RNV2) con óvulos de pacientes. **(b)** Índice de correlación ( $r$ ) entre el DFI de semen post descongelado y número de betas positivas que llegaron a término, recién nacidos vivos producto único (RNV) y recién nacidos vivos producto gemelar (RNV2) con óvulos de donantes.

a)

	DFI post descongelado			
	FIV		ICSI	
	$r$	$p$	$r$	$p$
Betas +	<b>-0.538*</b>	<b>0.038</b>	0.041	0.895
RNV	-0.341	0.214	0.121	0.693
RNV 2	-0.402	0.137	-0.116	0.706

\*  $p < 0.05$

b)

	DFI post descongelado			
	OVODON/FIV/ICSI		OVODON/ICSI	
	$r$	$p$	$r$	$p$
Betas +	0.315	0.376	-0.866	0.058
RNV	0	1	-0.707	0.182
RNV 2	-0.263	0.463	-0.354	0.559

\*  $p < 0.05$

En las siguientes micrografías se observan espermatozoides con diferentes índices de fragmentación del ADN tanto en fresco (**Figura 11**) como en post descongelación (**Figura 12**). Los espermatozoides que tiene un halo grande o mediano son espermatozoides que presentan un ADN sin fragmentación (flechas negras) (**Figura 12, 13, 14, 15 y 16**), mientras que los espermatozoides que tienen halos más pequeños o carecen de ellos nos indica algún grado de fragmentación en el ADN (flechas rojas) (**Figura 12, 14, 15 y 16**).

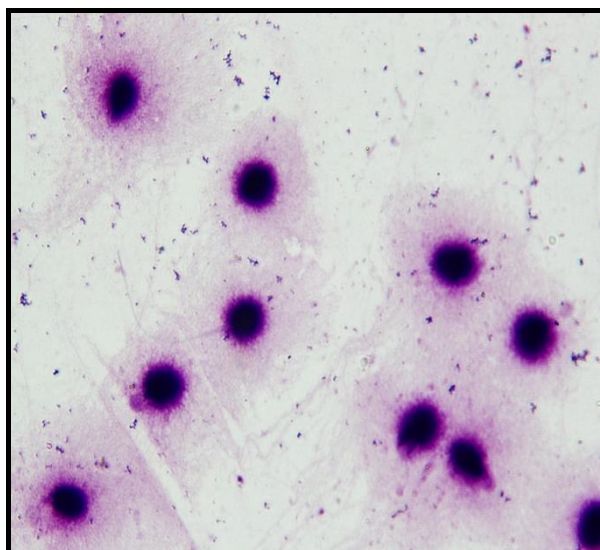


Figura 11.

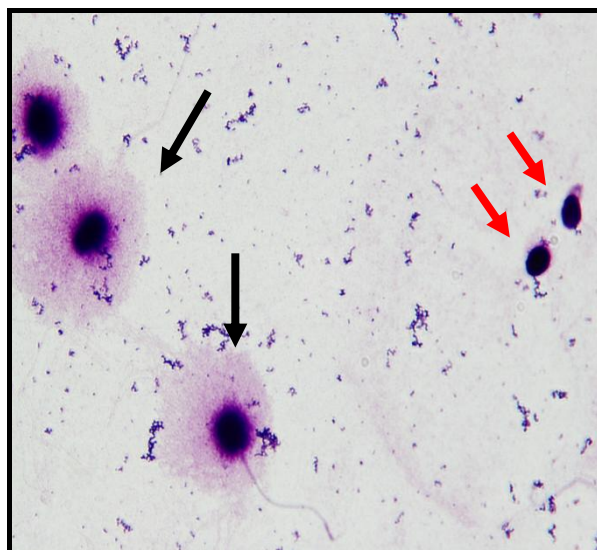


Figura 12.

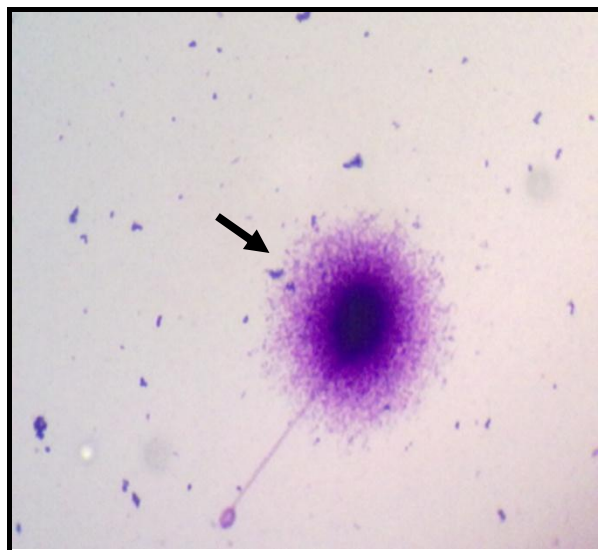


Figura 13.

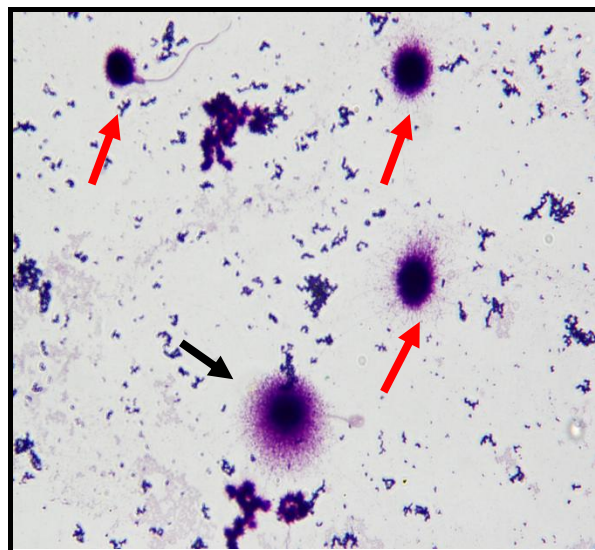


Figura 14.

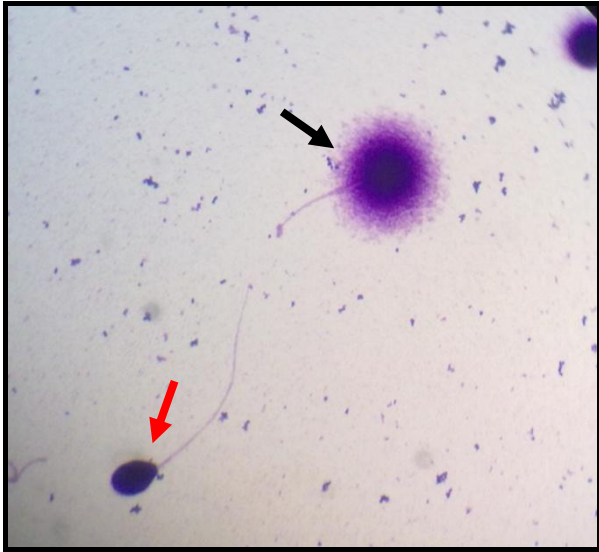


Figura 15.

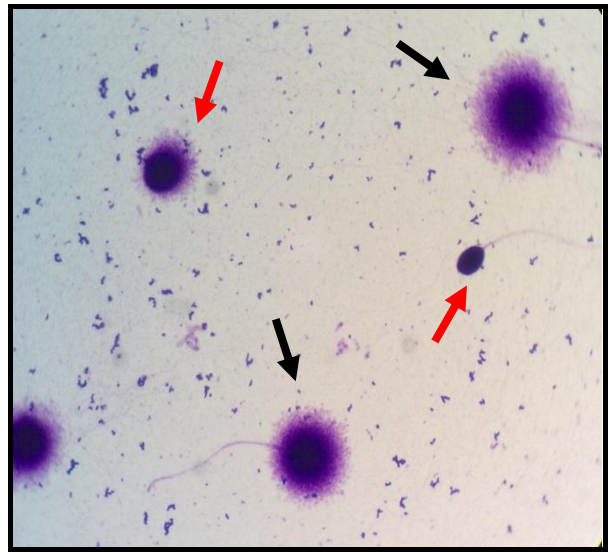


Figura 16.

## IX. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran que el proceso de criopreservación de las muestras de banco de semen de donantes, aumentó la fragmentación del ADN de los espermatozoides y disminuyó la movilidad espermática, además de que ambos parámetros se encuentran correlacionados. También se pudo observar que cuando se utilizan óvulos de pacientes u óvulos de donantes tanto en FIV como en ICSI existe una correlación negativa entre la fragmentación del ADN espermático y los resultados de las TRHA como es desarrollo embrionario y tasas de embarazo.

La concentración de espermatozoides disminuyó después de la criopreservación, esto debido al método utilizado y no a un efecto biológico como tal, ya que las muestras para ser congeladas se trabajaron en proporción 1:1 (semen/crioprotector) para obtener un volumen final de 4 ml, por lo cual disminuyó la concentración tal como lo observó Yogev y col. (2010). Aun así la cantidad recuperada de espermatozoides después del proceso de criopreservación es suficiente para las técnicas de reproducción asistida, ya que se necesita una concentración igual o superior a  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Galán y col., 2008).

La movilidad se sabe es de vital importancia para una fecundación exitosa, sin embargo, en general se ve severamente afectado después de la criopreservación, disminuyendo la capacidad funcional de los espermatozoides y las tasas de éxito de la TRHA (Partykaa y col, 2010). En el presente estudio, los resultados mostraron una disminución de los espermatozoides con movilidad progresiva y un aumento de los espermatozoides no progresivos e inmóviles después del proceso de criopreservación, en forma similar a otros reportes (Donnelly y col., 2001; Peris y col., 2004; Gandini y col., 2006).

El mecanismo por el cual disminuye la movilidad espermática no ha sido elucidado por completo. En el espermatozoide la movilidad es particularmente dependiente de la función de las mitocondrias, éstas se encuentran estratégicamente distribuidas alrededor de la pieza media del espermatozoide y se ha observado que el ATP generado por fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial interna es transferido a los microtúbulos para estimular la movilidad. Por tanto la reducción en movilidad espermática después de la criopreservación puede estar asociada a daño mitocondrial (Manosalva, 2005; Calamera y col., 2008; Partykaa y col., 2010).

A pesar de la aparente disminución de la movilidad espermática después del proceso de criopreservación, las muestras descongeladas lograron mantener valores aceptables que permiten ser manejadas para las TRHA. Algunos autores establecen como criterio aceptable la conservación de >30% de movilidad tras la descongelación, sin embargo aún sigue en debate el punto de corte del número de espermatozoides móviles necesario para alcanzar una tasa óptima de gestación (Torres y col., 2009).

Además de los parámetros utilizados en la evaluación clínica de la fertilidad masculina (movilidad, concentración, morfología), nuevos parámetros han sido incorporados para evaluar la capacidad funcional de los espermatozoides, uno de ellos es evaluar la integridad del ADN nuclear y ha alcanzado particular relevancia en la última década (Cruz y col., 2010).

Hoy en día evaluar la integridad del ADN espermático es de suma importancia debido a que alteraciones en la molécula podrían llevar a problemas en la fertilización y posterior desarrollo embrionario (Morales y col., 2007). Los resultados de este estudio mostraron un aumento en la fragmentación del ADN espermático después del proceso de criopreservación tal como han observado otros autores (Gandini y col., 2006; Yildiz y col., 2008; Berrios y Sánchez, 2011).

Se han descrito como las causas más frecuentes de pérdida de la función celular producidas por la criopreservación alteraciones de la membrana plasmática, daño mitocondrial, deterioro en la

integridad del ADN, aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la apoptosis, todas causan un efecto negativo sobre la fecundación (Berrios y Sánchez, 2011).

Con respecto a las ERO se sabe, éstas se forman y aumentan debido a que el proceso de criopreservación disminuye la actividad antioxidante de los espermatozoides comprometiendo así su funcionalidad. La acción de las ERO involucra la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática lo que a su vez produce cambios en la fluidez e incremento en la permeabilidad de ésta, así como la pérdida de ATP, que se ve reflejado en una disminución de la movilidad espermática, la viabilidad y la capacidad fertilizante del espermatozoide (Gosálvez y col., 2009 a; Said y col., 2010; Meseguer y col., 2011).

Autores como Lozano y col. (2009) observaron que al tratar espermatozoides con  $H_2O_2$  como agente oxidante se inició la movilización de calcio al citoplasma, lo que a su vez activó marcadores apoptóticos como caspasa-3 y caspasa-9 causando así fragmentación del ADN espermático. En este sentido, otro evento que incrementa la fragmentación del ADN espermático es la apoptosis y se ha observado que ésta es un mecanismo que desempeña un papel fundamental en la espermatogénesis, la respuesta testicular a lesiones tóxicas y la patogénesis de la infertilidad masculina. Sin embargo, el daño al ADN espermático después de la criopreservación, podría ser el resultado de forma indirecta de la acción de las ERO, ya que activan caspasas (3, 8 y 9) y endonucleasas espermáticas, lo que genera numerosas rupturas de las cadenas del ADN dando como resultado la fragmentación del ADN espermático (Gosálvez y col., 2009 a; Thomson y col., 2009).

Existen evidencias de que la cromatina de los espermatozoides de varones fértiles, resiste mejor el daño de la criopreservación, a diferencia de la de varones infértiles con parámetros de semen moderadamente bajos (Partykaa y col., 2010). También se ha observado el aumento de lesiones en la cromatina condensada después del proceso de congelación-descongelación en semen de hombres fértiles e infértiles (Hammadeh y col., 1999). Sin embargo, aproximadamente el 10% de los espermatozoides provenientes de hombres fértiles poseen niveles bajos de daño al ADN, mientras que en aquellos que provienen de hombres infértiles, este porcentaje oscila entre 20 y 25% (O'Brien y Zini, 2005; Hernández-Matos y col., 2010).

Uno de los objetivos de este estudio fue analizar la posible relación entre los parámetros seminales de concentración y movilidad con el DFI espermático, en los resultados de este estudio sólo se observa correlación entre el parámetro de movilidad tipo c y el DFI, ambos en post descongelación, lo que nos indica la posible presencia de ADN fragmentado en los espermatozoides móviles no progresivos. Esta relación se puede explicar debido a que la criopreservación aumenta el estrés oxidativo por la presencia de las ERO que desata una serie de mecanismos, principalmente en la mitocondria, como es la pérdida del potencial de membrana, posterior liberación del citocromo C y activación de caspasas, lo que finalmente genera daño al ADN tanto nuclear como mitocondrial y se ve reflejado con la pérdida de movilidad espermática (Donnelly y col., 2001; Venereo, 2002; Said y col., 2005; Hernández-Matos y col., 2010).

Algunos autores mencionan sobre la conveniencia de seleccionar los espermatozoides antes de ser sometidos a criopreservación lo que minimiza así el posible riesgo de contaminación por microorganismos presentes en el plasma seminal o espermatozoides que aún no completan su maduración con la finalidad de obtener sólo a los espermatozoides de mejor calidad después de la congelación (Edelstein y col., 2008; Said y col., 2010; Berrios y Sánchez, 2011). Ricci y col. (2009) por su parte observaron que el uso de técnicas de recuperación espermática reduce significativamente la cantidad de espermatozoides apoptóticos lo que a su vez se traduce como muestras con menor grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides y mayor éxito en las TRHA.



Los informes sobre la relación entre la integridad del ADN y los parámetros del semen han sido variados, ya que en algunos estudios se observa que la fragmentación del ADN no causa directamente pérdida de la movilidad de los espermatozoides y ambos deben ser considerados como parámetros independientes para la evaluación de la calidad del espermatozoide (Yildiz y col., 2008; Gosálvez y col., 2009 b; Mehdi y col., 2009), pero en otros estudios los resultados han mostrado una correlación significativa entre la integridad del ADN espermático y los parámetros seminales como concentración, movilidad y morfología (Varghese y col., 2009; Cruz y col., 2010). Las diferencias de los resultados entre la movilidad y la integridad del material genético de los espermatozoides en los diversos estudios realizados puede explicarse en parte por el tamaño y tipo de poblaciones empleadas en cada uno de ellos, así como también a la sensibilidad de las técnicas empleadas para evaluar la fragmentación del ADN (Irvine y col., 2000).

El análisis del semen informa sobre el potencial de fertilidad del varón, pero no tiene valor predictivo absoluto de fertilidad, por lo tanto, evaluar el ADN espermático y su relación con los resultados de la TRHA resulta de gran interés (Cruz y col., 2010). En este estudio en la mayoría de los resultados no se observó una relación entre los parámetros evaluados, sin embargo si se observó correlación negativa en FIV entre el DFI y las tasas de embarazos, en ICSI entre el DFI y el desarrollo embrionario y en OVODON/ICSI entre el DFI y las tasas de embarazo.

Los estudios son controvertidos en cuanto a la relación que existe entre el DFI y la tasa de fertilidad en las TRHA. Mientras que en algunos estudios no observan relación entre el DFI y la probabilidad de embarazo (Yilmaz y col., 2010; Hee-Jun y col., 2011; Meseguer y col., 2011), en otros estudios han relacionado la posible influencia de la integridad del ADN espermático con alteraciones en las tasas de fecundación, gestación y embarazo tanto en FIV e ICSI (Chun-Chia y col., 2005; Muriel y col., 2006; Velez y col., 2008; Avendaño y col., 2010).

Al analizar los resultados obtenidos tanto en FIV como en ICSI y su relación con la integridad del ADN espermático, estudios sobre la criopreservación sugieren que cambios en las proteínas y lípidos de la membrana espermática, inducidas en el descongelamiento, no son enteramente reversibles lo que podría tener implicaciones sobre la estructura de los receptores y por lo tanto sobre la interacción espermatozoide-óvulo al momento de la fertilización (Stornelli y col., 2005). Por otro lado, de acuerdo a algunos autores, el potencial de desarrollo embrionario no se ve afectado por los niveles del DFI espermático hasta el día 3, ya que hasta entonces se activa el genoma embrionario, tiempo suficiente para que los óvulos y embriones puedan reparar los daños existentes en el ADN del espermatozoide. Si el espermatozoide ha sufrido sólo leves daños en el ADN, los óvulos deben ser capaces de repararlo, pero el alcance de esta reparación dependerá de la calidad de los óvulos, por lo tanto, si el desarrollo embrionario falla puede ocurrir como resultado de algún defecto en el óvulo (Yilmaz y col., 2010; Meseguer y col., 2011). Otro factor que debe ser considerado al analizar los resultados obtenidos en este estudio es la etiología de la paciente receptora, ya que aunque se utilizan óvulos de donantes, en algunos casos, esto puede repercutir en los resultados de fertilización y desarrollo embrionario (Meseguer y col., 2011).

Tanto en FIV como en ICSI para que se lleve a cabo la transferencia de embriones, se eligen sólo embriones con el mejor aspecto, lo que probablemente disminuye el riesgo de haber utilizado tanto espermatozoides con ADN fragmentado como transferir embriones de mala calidad y esto puede reducir los efectos adversos de los daños del ADN espermático, las TRHA y sus resultados (Meseguer y col., 2011).

Finalmente las muestras de semen de donantes tienen que cumplir con las características adecuadas para que sea una muestra de banco de semen, sin embargo, pese a que la calidad es óptima, existen diferentes procesos que pueden provocar alteraciones y con ello disminuir su capacidad fecundante, uno de estos procesos es la criopreservación.

La criopreservación a causado un gran impacto sobre las reproducción humana al permitir conservar a los espermatozoides en el tiempo potencialmente fértil pero éste proceso genera diferentes tipos de estrés que pueden inducir daños irreversibles en los espermatozoides, uno de éstos es la fragmentación del ADN, el cual juega un papel sumamente importante para que se lleven acabo los procesos de fecundación y desarrollo embrionario.

Por lo tanto es importante seguir mejorando los protocolos de criopreservación para causar el menos daño posibles a las muestras de semen; así mismo pese a que las muestras de donantes de semen son de excelente calidad, la evaluación de la integridad del ADN espermático junto con los estudios convencionales de semen podría ser una herramienta útil para indicar la calidad del espermatozoide lo que se vería reflejado en un mayor éxito reproductivo.

## **X. CONCLUSIONES**

- El proceso de criopreservación aumentó el índice de fragmentación de ADN espermático en las muestras de banco de semen de donantes.
- Después del proceso de criopreservación el parámetro de movilidad en el espermatozoide disminuyó y se observó relación entre éste con el índice de fragmentación de ADN espermático.
- El índice de fragmentación de ADN espermático si se relaciono con las tasas de embarazo y desarrollo embrionario, tanto con óvulos de donantes como de pacientes en las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad FIV e ICSI.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal A y Allamaneni SS (2005). Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Revista Internacional de Andrología*. **3**, 31-37.
- Aitken JR and Koppers AJ (2011). Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*. **13**, 36-42.
- Albert C, Romero JL, Florensa M, Gadea B y Escribá MJ (2008). Procesado de muestras de semen patológicas para ICSI. En: Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J, Cobo A, Romero J, de los Santos MJ y Pellicer A. 3ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España. 157-164.
- Álvarez JG (2007). Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Revista Internacional de Andrología*. **5**, 354-363.
- Anderson D, Dobrzyska MM, Yu T-W, Cordelli E, Gandini L and Spano` M (1997). DNA integrity in human sperm. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. **17**, 97-102.
- Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP (1997). Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Experimental Cell Research*. **236**, 231-7.
- Arteaga MM, García-Peláez I y Gallegos SS (2007). Estatus del embrión humano. *Archivos Mexicanos de Anatomía Nueva Época*. **2**, 51-54.
- Avendaño C, Franchi A, Duran H and Oehninger S (2010). DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility and Sterility*. **94**, 549-557.
- Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, Gómez C, Lozano JM, Reguero MT (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. **57**, 291-300.
- Becker WM, Kleinsmith LJ y Hardin J (2006). El mundo de la célula. 6ª ed. Editorial Pearson. Madrid. 57-72.
- Bellido GM (1999). Reproducción en el varón. En: Fisiología Humana. Tresguerres JA, Sánchez JE, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil-Loyzaga P, Lahera V, Martínez J, Mora F, Rodríguez R, Romano M, Tamargo J, Zarco P. 2ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España. 1049-1063.
- Berrios O y Sánchez GR (2011). Congelación ultra rápida de espermatozoides humanos: Efecto sobre la función espermática y producción de especies reactivas de oxígeno. *International Journal of Morphology*. **3**, 899-906.
- Bouvet BR, Paparella CV y Feldman RN (2007). Estrés oxidativo y su efecto sobre calidad seminal. *Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*. **7**, 57-36.
- Briceño TL, Díaz I, Gómez C, Pablo y Cavelier C, Luis E (2008). Varicocele e infertilidad masculina. *Revista Urología Colombiana*. **17**, 63-69.
- Brugo OS, Chillik C y Kopelman S (2003). Definición y causas de la infertilidad. *Revista*

*Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* **54**, 227-248.

- Bungum M, Bungum L and Giwercman A (2011). Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian Journal Andrology.* **13**, 69-75.
- Calamera JC, Buffone MG, Doncel GF, Brugo-Olmedo S, de Vincentiis S, Calamera MM, Storey BT and Alvarez JG (2008). Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa. *Fertility and Sterility.* 1-6.
- Campos I, Magán RM, Ruzafa C y Muriel L (2008). Congelación de semen en píldoras. En: Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J, Cobo A, Romero J, de los Santos MJ y Pellicer A. 3ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España. 31-37.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology.* **27**, 53-9.
- Chun-Chia H, Pei-Cheng L, Hui-Mei T, Tzu-Chun C, Chung-Hsien L and Maw-Sheng L (2005). Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility and Sterility.* **84**, 130-140.
- Corabian P (1999). In vitro fertilization and embryo transfer as a treatment for infertility. Alberta Heritage Foundation for Medical Research.
- Cordelli E, Fresegna AM, Leter G, Eleuteri P, Spano` M and Villani P (2003). Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X-irradiation. *Radiation Research.* **160**, 443–451.
- Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas.* **31**, 120-131.
- Corts, PA (2010). [en línea] [http://www.ediciona.com/esquema\\_de\\_la\\_fecundacion-dirpi-14934.htm](http://www.ediciona.com/esquema_de_la_fecundacion-dirpi-14934.htm) [Consulta 16 de mayo del 2011].
- Cruz I, Colmenares M, Berrueta-Carrillo L, Gómez-Pérez R, Montes H, Berrueta L, Salmen S y Jesús Alfonso Osuna (2010). Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen. *Investigación Clínica.* **51**, 87–99.
- Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE (2004). Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertility and Sterility.* **82**, 1443–5.
- Devroey P, Fauser FC and Diedrich K (2009). Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Human Reproduction Update.* **15**, 391–408.
- Dohle GR, Diemer T, Giwercman A, Jungwirth, Kopa Z, Krausz C (2010). Guía clínica sobre la infertilidad masculina. *European Association of Urology.* 1-60.
- Donnelly T, Steele E, McClure N, Lewis S (2001). Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction.* **16**, 1191-1199.

- Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A and Oehninger S (2001). Cryopreservation–thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *Journal of Andrology*. **22**, 646–651.
- Edelstein A, Yavetz H, Kleiman SE, Botchan A, Hauser R, Paz G y Yogev L (2008). Deoxyribonucleic acid-damaged sperm in cryopreserved-thawed specimens from cancer patients and healthy men. *Fertility and Sterility*. **90**, 205–208.
- Encyclopedia Britannica (2007). Male reproductive system (human). [en línea] [http://withfriendship.com/user/neeha/male-reproductive-system-\(human\).php...](http://withfriendship.com/user/neeha/male-reproductive-system-(human).php...) [Consulta 13 de junio del 2011].
- Evenson DP and Wixon R (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Journal Elsevier Health Theriogenology*. **65**, 979–991.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*. **14**, 1039-49.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*. **23**, 25-43.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R and Alvarez JG (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*. **24**, 59-66.
- Fuentes-Prior P and Salvesen GS (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*. **384**, 201–232.
- Galán A, Campos P, Blanco C, Salinas R y Cobo A (2008). Inseminación de los ovocitos. En: Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J, Cobo A, Romero J, de los Santos MJ y Pellicer A. 3ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España. 151-156.
- Gama S, Costa E, Rego M (2009). Alterations in the Spermogram in Portuguese Infertile Couples. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. **26**, 119-126.
- Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spano M and Dondero F (2006). Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell and Tissue Banking*. **7**, 91–98.
- Ganong WF (2004). Fisiología médica. 19ª ed. Editorial El Manual Moderno. México. 462-472.
- García FG, Morera MJF, Monzó MA, Morales SG, Fernández CP, Pellicer MA, Jiménez CF (2010). Impacto del factor masculino sobre la infertilidad: papel del urólogo en una Unidad de Reproducción Asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. **27**, 513-521.
- García RJ, Carriazo PG, Aldana EJ (2006). Guía de reproducción Humana Asistida en el servicio andaluz de salud. Consejería de Salud. Junta de Andalucía. Sevilla. 1-84.
- Garrido N y Meseguer M (2008). Bancos de semen. En: Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J, Cobo A, Romero J, de los Santos MJ y Pellicer A. 3ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España. 47-49.

- Gil VA, Cardona-Maya W y Cadavid JA (2007). Muerte embrionaria temprana: ¿Tiene influencia en el factor masculino? *Urología Experimental e Investigación*. **60**, 1.057-1.068.
- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowka H and Darzynkiewicz Z (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research*. **207**, 202–205.
- Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez E, Nuñez R, Fernández JL, Caballero P, López-Fernández C and Holt WV (2009) (a). A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertility and Sterility*. **92**, 1915-1919.
- Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez E, López-Fernández C (2009) (b). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertility and Sterility*. **92**, 170–173.
- Grunewald S, Kriegel C, Baumann T (2009). Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. **24**, 2071–2078.
- Gutiérrez GR (2007). Daño al ADN espermático: aspectos clínicos y biológicos. *Revista Cubana de Endocrinología*. **18**.
- Guyton AC (2001). Tratado de fisiología médica. 6ª edición. Editorial Mc Graw Hill interamericana, México. 1099-1114.
- Halosperm® (2005). Manual del usuario. Biotec Indas Laboratorios.
- Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosebaum P and Schmidt W (1999). Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology*. **22**, 155–162.
- Hee-Jun C, Da-Yeon C, Soon-Young C, Jong-Hyun K, Gi-Young K, Jae-Seok L, Hee-Sun L, Myung-Hee K and Sung-Il R (2011). Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. **38**, 10-17.
- Hernández-Matos Y, Delgado-Roche L, López-Pérez R, Martínez-Sánchez G, Mallok A (2010). Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. **18**, 153-158.
- Irvine D, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, Aitken J (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology*. **21**, 33-44.
- Jausoro A (2000). Reproducción Humana Asistida: Descripción de las opciones terapéuticas disponibles. Vitoria-Gasteiz. Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco. Informe nº: Osteba 1-110.
- Junqueira C y Carneiro J (2005). Histología básica. 6ª ed. Editorial Masson. España. 415-431.

- Lavin N (2003). Endocrinología y Metabolismo. 3ª ed. Editorial Marban Libros. Madrid. 883.
- Lesson TS y Lesson CR (1984). Histología. 4ª edición. Editorial Interamericana. México. 517-540.
- Levy MN, Stanton BA y Koeppen BM (2006). Fisiología. 4ª ed. Editorial Elsevier. España. 712-722.
- Lozano GM, Bejarano I, Espino J, Gonzáles D, Ortiz A, García JF, Rodríguez AB and Pariente JA (2009). Relationship between Caspase Activity and Apoptotic Markers in Human Sperm in Response to Hydrogen Peroxide and Progesterone. *Journal of Reproduction and Development*. **55**, 615-621.
- Málaga CY, Ortiz ND, Hernández MI, Tovar JM, Ayala RA (2005). Detención de la espermatogénesis. *Ginecología y Obstetricia*. **73**, 500-508.
- Manosalva PI, Cortés C, Leyva VV, Valdivia CM, Reyes SM, Barros RC y Moreno MR (2005). Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Revista de Investigaciones veterinaria* **16**, 114-128.
- Martin G, Sabido O, Durand P (2004). Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction*. **71**, 28–37.
- Mehdi M, Khantouche L, Ajina M and Saad A (2009). Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Journal of Andrology*. **41**, 383-386.
- Mercader A, Buendía P y Simón C (2008). Cultivo prolongado del embrión hasta blastocisto: cocultivo. En: Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J, Cobo A, Romero J, de los Santos MJ y Pellicer A. 3ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España. 215-223.
- Meseguer M, Ruiz A, Garrido N, Zuzuarregui J, Reis S, Escudero E, Pellicer A y Remohí J (2002). Reproducción humana. Congelación y banco de semen: métodos, organización e indicaciones. 2ª ed. Editorial Mc Graw-Hill. España. 366-368.
- Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernandez JL (2011). Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility*. **95**, 124-128.
- Morales R, Lledó B, Ortiz JA, Rodríguez-Arnedo D, Fabregat A, Bernabeu R (2007). Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. **24**, 305-313.
- Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A and de los Santos MJ (2006). Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation levels as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. **85**, 371-383.
- Narváez RH (2004). Actualización en la valoración y manejo de la infertilidad masculina. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. **55**, 60-70.



- Navarro LC (2009). Gametogénesis [en línea]  
<http://mural.uv.es/monavi/disco/primero/biologia/Tema28.pdf> [consulta 20 de mayo del 2011].
- O'Brien J and Zini A (2005). Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology*. **65**, 16-22.
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK (2004). Cryopreservation band thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. **71**, 1828–1837.
- Partykaa A, Niz'an'skib W and Łukaszewicza E (2010). Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology*. **74**, 1019-1027.
- Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey JL (2004). Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal of Andrology*. **25**, 224-233.
- Pires I (2010). Semen analysis in laboratory practice. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. **27**, 211-221
- Poirot C y Cherruau B (2005). Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. **39**, 225-41.
- Remohí J, Romero JL, Pellicer A, Simon C, Navarro J (2000). Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 2ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España. 265-351.
- Ricci G, Perticarari S and Boscolo R (2009). Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertility and Sterility*. **91**, 632–638.
- Rosas MR (2007). Infertilidad masculina. Causas, diagnóstico y tratamiento. Ámbito Farmacéutico. *Divulgación sanitaria*. **26**,70-75.
- Ross HM y Pawlina W (2004). Histología texto y atlas color con biología celular y molecular. 4ª ed. Editorial Panamericana. Buenos Aires. 684-727.
- Ruiz M y Clatayud C (2009). El Factor masculino I. Estudio básico del varón. En: Reproducción asistida: Abordaje en la práctica clínica. Bonilla-Musoles F, Dolz M, Moreno J, Raga F. 1ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid España. 161-181.
- Sadler TW (2004). Embriología Medica Con Orientación Clínica. 9ª ed. Editorial Panamericana. México. 272-275.
- Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ and Sikka SC (2005). Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertility and Sterility*. **83**, 95–103.
- Said TM, Gaglani A y Agarwal A (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Online*. **21**, 456– 462.
- Sailer BL, Jost LK and Evenson DP (1995). Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *Journal of Andrology*. **16**, 80–87.

- Sánchez M, César M, Farré R, Magaña P y Aulesa C (2005). Varicocele: fisiopatología y actualización diagnóstica desde el laboratorio. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. **22**, 261-267.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D (2004). Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. **82**, 378- 83.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G (2005). Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reproduction*. **20**, 3446-51.
- Serzedello PT, Pimienta BR, Montagnini SD, Adelaide CM, Schor N and Pereira CA (2006). Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and Sterility*. **86**, 597-600.
- Sgreccia E y Carrasco PI (2006). El embrión humana en la fase de la preimplantación: Aspectos científicos y consideraciones bioéticas. 1-43.
- Shamsi MB, Kumar R and Dada R (2008). Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian Journal of Medical Research*. **127**, 115-123.
- Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertility and Sterility*. **73**, 43-50.
- Spanò M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A and Gandini L (1999). Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swimming up and cryoconservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Molecular Human Reproduction*. **5**, 29–37.
- Speer-Williams J (2010). Destrucción masiva del ADN. [en línea] <http://thejunglesroom.blogspot.com/2010/10/destruccion-masiva-de-adn.html> [Consulta: 17 de Mayo del 2011].
- Steven S y Grace KL (1998). El sistema reproductor masculino y la toxicología. En: Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Grace Kawas Lemasters. 3ª ed. Editorial Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Madrid cap. 9.4.
- Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*. **25**, 28-35.
- Tapia SR y Rojas RJ (2003). Semiología del análisis de semen. *Boletín del Colegio Mexicano de Urología*. **18**, 47-52.
- Teppa GA y Palacios TA (2004). Evaluación actual de la infertilidad masculina. *Investigación clínica*. **45**, 355-370.
- Tesarik J, Mendoza C, Greco E (2002). Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*. **17**, 184-9.

- Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*. **24**, 2061–2070.
- Torres P, Peinado I, Orden M, Romeu M y Romeu A (2009). Estudio de la calidad seminal y tasa de gestación tras inseminación artificial y FIV con semen de donante. ¿Influye la elección del banco? *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. **26**, 7-13.
- Varghese AC, Bragais FM, Mukhopadhyay D, Kundu S, Pal M, Bhattacharyya AK and Agarwal A (2009). Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Journal of Andrology*. **41**, 207–215.
- Velázquez CG (2009). Fisiología de la reproducción humana. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. **1**, 115-30.
- Velez CJ, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jimenez C and Wittemer C (2008). 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*. **90**, 1792-1799.
- Venereo GJ (2002). Daño Oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. **31**, 126-33.
- World Health Organization (2010). Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction: Cambridge University Press, Nueva York.
- Yen SS, Jaffe RB y Barbieri RL (2001). Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ª ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 664-675.
- Yildiz C, Fleming C, Ottaviani P and McKerlie C (2008). Fresh and frozen–thawed sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertility, embryo development, and live-born offspring of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mice. *Cryobiology*. **57**, 156–162.
- Yılmaz S, Zergeroğlu AD, Yılmaz E, Sofuoğlu K, Delikara N, Kutlu P (2010). Effects of Sperm DNA Fragmentation on Semen Parameters and ICSI Outcome Determined by an Improved SCD Test, Halosperm. *International Journal of Fertility and Sterility*. **4**, 73-78.
- Yogev L, Kleiman SE, Shabtai E, Botchan A, Paz G, Hauser R, Lehavi O, Yavetz H and Gamzu R (2010). Long-term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration. *Human Reproduction*. **25**, 1097–1103.
- Zini A, Bielecki R, Phang D and Zenzes MT (2001). Correlations between two markers of sperm DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*. **75**, 674–677.
- Zulategui JF, Cobo A, Romero JL, Galán A, Albert C y de los Santos MJ (2008). Inyección intracitoplásmica del espermatozoide. En: Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J, Cobo A, Romero J, de los Santos MJ y Pellicer A. 3ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España. 165-176.