



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“DETECCION DE DAÑO GENÓMICO EN GAMETOS
MASCULINOS HUMANOS MEDIANTE ELECTROFORESIS
UNICELULAR ALCALINA (ENSAYO COMETA)”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

PRESENTA:

JORGE ALDAIR CASILLAS PILGRAM

DIRECTOR DE TESIS.

DRA. ELIA ROLDÁN REYES



México D.F.

Septiembre 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta este día y realizar y cumplir una de mis metas en la vida y por darme la oportunidad de tener a mi familia a mi lado.

A mis Padres por siempre estar junto a mi apoyándome y confiando en cada momento y por todos los consejos y pláticas, mil gracias...

A mis hermanos por todos los momentos de complicidad y alegrías, gracias Omar, Miguel, Karen y Edwin.

A mi esposa Ivon por llegar a mi vida en el momento correcto y permanecer a mi lado y motivarme durante este proyecto.

A la Dra. Elia Roldan por la confianza para dejar en mis manos este proyecto y brindarme sus conocimientos y consejos académicos y personales.

A todas las personas con quien tuve el agrado de trabajar y aprender de ellos también, Aarón, Aline, Cinthya, Héctor y aquellos a quien no mencione pero apoyaron también.

A mis compañeros y amigos que estuvieron conmigo en esta carrera, Macos, Alejandro, Marin y Jonathan.

DEDICATORIAS

A mis padres que con mucho esfuerzo cariño y apoyo contribuyeron para lograr este sueño los amo...

A mis hermanos porque siguen el mismo camino de éxitos.

A mi esposa y amor de mi vida “porque eres la hebra complementaria de mi ADN”.

A mi pequeña Odette por ser el motorcito para lograr más metas en la vida, te amo.

La presente tesis se desarrolló en el laboratorio 2 de Citogenética y Mutagénesis planta alta de la UMIEZ de la Facultad de estudios superiores Zaragoza.

Durante el desarrollo de esta investigación se recibió el apoyo de Laura Aline López García, Aarón Galindo Vega y Cristina Alvarado Domínguez.

Se recibió el financiamiento de **PAPIIT-IN213013-3**

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. El espermatozoide.....	5
2.2. Espermatogénesis y espermiogénesis.....	5
2.3. Espermiogénesis.....	5
2.4. Viabilidad de las células.....	9
2.5. Daño del ADN espermático.....	9
2.6. Ensayo cometa.....	11
2.7. El ensayo cometa en espermatozoides de humanos.....	14
2.8. Fragmentación del ADN espermático y su relación con la fertilidad....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos particulares.....	19
6. METODOS.....	20
6.1. Evaluación de calidad espermática.....	20
6.2. Criterios de inclusión y exclusión	20
6.3. Tamaño de la muestra.....	20
6.4. Ensayo cometa.....	21
6.5. Electroforesis.....	21
6.6. Tinción y lectura de las láminas.....	22
6.7. Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS	24
7.1. Análisis espermatozobioscópico.....	24
7.2. Ensayo cometa.....	26
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	33
8.1. Ensayo cometa y calidad seminal.....	33
8.2. Cáncer, infertilidad y fragmentación del ADN espermático.....	37
9. CONCLUSIONES.....	42
10. PERSPECTIVAS.....	43
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
12. ANEXOS	

1. RESUMEN

Se realizó análisis espermatozoides y ensayo cometa (electroforesis unicelular en agarosa) a 5 muestras de líquido seminal de hombres jóvenes entre 18 y 25 años, clínicamente sanos, 8 provenientes de individuos con infertilidad y 2 sobrevivientes a linfoma de Hodgkin. Las espermatozoides se realizaron a individuos con abstinencia sexual de 3 días como mínimo, a los cuales se les aplicó un cuestionario para recabar información acerca de sus hábitos y estado de salud en general, se les pidió su consentimiento informado. La electroforesis unicelular en agarosa a pH alcalino (ensayo cometa) implica la descondensación previa del ADN espermático, lisis celular en soluciones a pH de 7.5, desenrollamiento del ADN espermático, corrimiento de la electroforesis en un buffer pH= 13.0 y tinción con Bromuro de Etidio. La lectura se realizó en microscopio de fluorescencia a 100X, evaluando 300 células por individuo. Se categorizó el daño al ADN en: bajo, medio y alto, esto con ayuda de una reglilla graduada en micrómetros. Los individuos infértiles y sobrevivientes a cáncer presentan una tendencia más marcada de fragmentación del ADN espermático en relación con los normales (NL). Resultados mostraron que existen roturas de cadena simple en las muestras cuyos valores seminales se encuentran disminuidos así como en muestras de individuos infértiles demostrando la relación que existe entre la calidad seminal y calidad del ADN del espermatozoide, se llegó a la conclusión de que el ADN fragmentado está estrechamente relacionado con la baja calidad seminal así como la infertilidad.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El espermatozoide

El espermatozoide es el gameto masculino, que resulta del proceso de la espermatogénesis que se lleva a cabo en los túbulos seminíferos de los testículos, el cual tiene como objetivo alcanzar el óvulo y fusionarse con él para transmitir los genes paternos y posteriormente desarrollar un embrión (Ruiz, 1988). La espermatogénesis involucra una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias, dos divisiones meióticas de los espermatocitos, una remodelación de las espermátides durante la espermiogénesis y la liberación de estos a los túbulos seminíferos (Eddy, 1994).

Durante la diferenciación de las espermátides ocurren de manera secuencial varios procesos morfogénicos, que incluyen, la formación del acrosoma, del flagelo, la reorganización mitocondrial, la eliminación del citoplasma residual por la absorción de las células de Sertoli y la conformación nuclear, que conlleva a la sustitución de las histonas somáticas por protaminas con la capacidad de formar puentes disulfuro, las que le confieren una gran resistencia a los agentes físicos y químicos (Hernández, 2004).

2.2 Espermatogénesis y espermiogénesis

La espermatogénesis es el proceso por el cual una población de células germinales llamadas espermatogonias van a diferenciarse y producir espermatozoides, dura 64 días aproximadamente, donde las espermatogonias pasan principalmente por tres fases: espermatogoniogénesis, maduración de espermatocitos y espermiogénesis, que consiste en la citodiferenciación de las espermátidas. Este proceso se lleva a cabo desde las células de Sertoli hasta el epidídimo donde se da el almacenamiento transporte y maduración de los espermatozoides (Holstein *et al.* 2003).

2.3 Espermiogénesis

El proceso de diferenciación de las espermátidas a espermatozoides se denomina espermiogénesis. Este proceso termina con la liberación de las células del epitelio germinal. En este punto, las células libres ya se denominan

espermatozoides. Durante la citodiferenciación de las espermatidas, tienen lugar tres procesos: Condensación de la cromatina nuclear hasta una décima parte del volumen que ocupa en una espermatida inmadura. Formación del acrosoma por el aparato de Golgi. Desarrollo de las estructuras del flagelo e implantación en el núcleo. Las espermatidas maduras liberadas por el epitelio germinal como espermatozoides son transportadas a través del epidídimo durante aproximadamente 12 días más de esta manera, dependiendo de la especie un ciclo de espermatogénesis completo, desde espermatogonia a espermatozoide maduro, durará como mínimo 86 días (Holstein *et al.*, 2003).

Esta célula está formada por tres partes fundamentales, por una cabeza en la cual el extremo anterior se forma el acrosoma, estructura que permite que el espermatozoide atraviese la membrana del óvulo ya que posee hidrolasas ácidas como la fosfatasa ácida, catepsina que es una enzima proteolítica, la hialuronidasa que ataca a las mucoproteínas, la cabeza es la que contiene el núcleo el cual contiene el ADN y acrosina. En la parte posterior de la cabeza se encuentra el centriolo el cual es necesario para que se inicie la división en el cigoto. La pieza media contiene la base del flagelo y a su alrededor de esta se encuentran las mitocondrias que se encargan de proporcionar la energía para la locomoción de la célula y que poseen enzimas oxidativas, por último se encuentra el flagelo (fig. 1), que es la parte más larga del espermatozoide que se rodea por una vaina proteínica que se forma por nueve filamentos externos y dos centrales que se constituyen de tubulina que es una proteína contráctil y que lo hace en presencia del ATP, se asocia a la dineína ATPasa (Ruiz, 1988).

La cola o flagelo del espermatozoide humano se divide en cuatro regiones: pieza conectora o cuello (0.5 μm), pieza media (3.5 μm), pieza principal (50 μm) y pieza final (3 μm), alcanzando el espermatozoide un largo total aproximado de 60 μm (Romanato, 2009).

El axonema o filamento axial, compuesto por un par central de microtúbulos rodeado por nueve dobletes, se extiende a lo largo de la totalidad de la cola del espermatozoide constituyendo su aparato motor. Asociadas a cada par de microtúbulos se encuentran las fibras densas, que se extienden desde la pieza media hasta algún punto variable de la pieza principal.

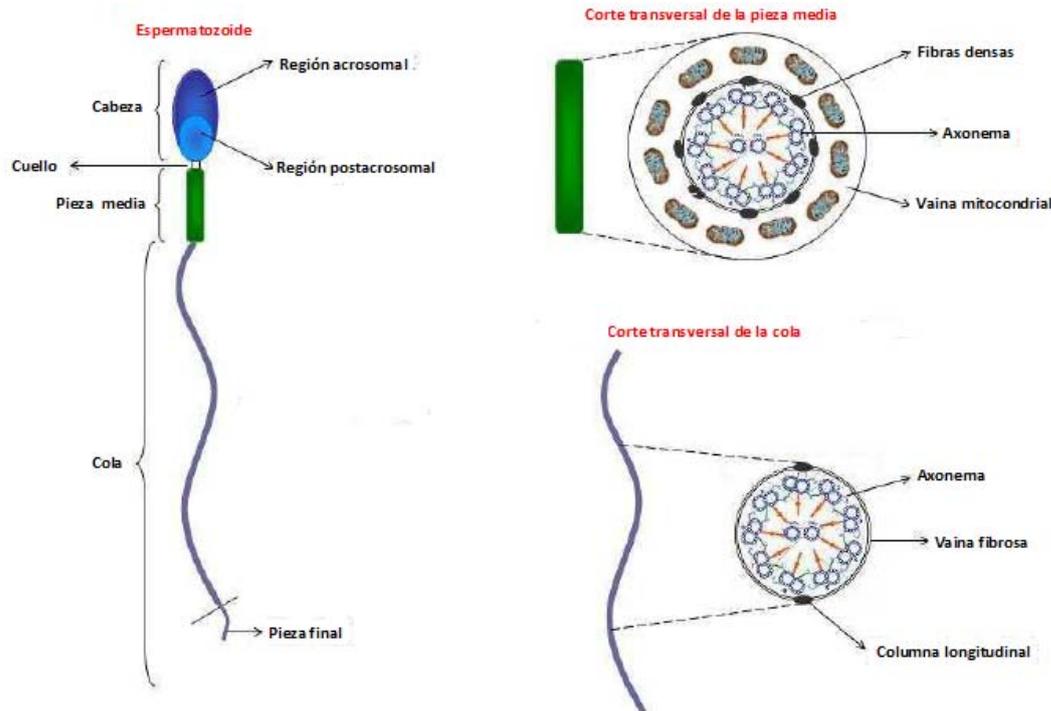


Fig. 1. Estructura del espermatozoide de humano (Matsumoto *et al.*, 1996).

La pieza principal se caracteriza, además, por la presencia de la vaina fibrosa formada por dos columnas longitudinales conectadas entre sí por una serie de filamentos, que rodean a los microtúbulos y a las fibras densas asociadas. La pieza media contiene la vaina mitocondrial, formada por un número (específico para cada especie) de mitocondrias distribuidas en forma helicoidal alrededor del axonema y que constituye el sitio de obtención de energía del espermatozoide. La pieza final está compuesta simplemente por el axonema (Romanato, 2009).

La cabeza del espermatozoide comprende al núcleo y al acrosoma y, en el humano, posee un largo aproximado de 5 a 6 μm y un ancho de 2,5 a 3 μm . Se pueden distinguir en ella dos regiones principales: acrosomal (anterior) y post-acrosomal (posterior), separadas por una zona extremadamente importante y funcionalmente característica: el segmento ecuatorial rodeando al núcleo del espermatozoide, se encuentran cuatro membranas, desde afuera hacia adentro, están la membrana plasmática o celular, las membranas acrosomales externa e interna y la membrana nuclear (Romanato, 2009).

El acrosoma es una vesícula lisosomal que contiene una gran variedad de enzimas líticas, entre las que se encuentran la hialuronidasa y acrosina que son fundamentales para que el espermatozoide pueda atravesar las cubiertas

externas del ovocito. El segmento ecuatorial es la región a través de la cual se produce la fusión del espermatozoide con el oolema. Su membrana plasmática es muy estable y se cree que podría actuar como barrera impidiendo el pasaje de partículas entre los dominios de membrana de la región anterior y post acrosomal (Curry y Watson, 1995).

El volumen del núcleo espermático es significativamente menor que el núcleo de una célula somática (aproximadamente seis veces), La cadena de ADN se compacta en forma de lámina plegada β (Hernández, 2004), lo cual se logra además a través de una organización muy particular de la cromatina diferente de la de las células somáticas que genera una cromatina altamente condensada (Balhorn, 1982; Ward *et al.*, 1991). Este grado de compactación de la cromatina espermática es posible debido a que durante la espermatogénesis testicular la mayor parte de las histonas cromatínicas es reemplazada por las protaminas (Hernández, 2004).

El reempaquetamiento del genoma característico del espermatozoide es iniciado por la síntesis y ubicación de las protaminas en el núcleo durante el último estadio del espermátida (Bellvé *et al.*, 1975; Goldberg *et al.*, 1977; Balhorn *et al.*, 1984), esta culmina con la unión de las protaminas al ADN desplazando al resto de las proteínas que se encuentran unidas a la cromatina (Yanagimachi, 1994). El complejo altamente condensado de protamina – ADN es estabilizado por uniones de puentes disulfuro intra e intermoleculares entre los residuos de cisteína de las protaminas, confiriendo al núcleo espermático una extraordinaria estabilidad mecánica y química. Esta estabilidad se incrementa aún más por acción del zinc (de origen prostático) presente en el plasma seminal. El zinc se une a los grupos sulfhidrilo libres de las protaminas impidiendo que tenga lugar el intercambio entre estos residuos y los puentes disulfuro ya formados (Kvist, 1980; Yanagimachi, 1994).

De tal manera con este empaquetamiento se impediría la descondensación prematura de la cromatina durante el tránsito del espermatozoide por el tracto genital masculino y el femenino antes de que se incorpore al ooplasma (Romanato, 2009).

Se han identificado dos grupos de protaminas, P1 y P2, presentes en los espermatozoides de todas las especies, tienen un alto contenido de cisteína y arginina, las P2, solo están presentes en algunas especies (incluyendo el humano), y además contienen histidina y pueden unir Zn^{2+} . Estas uniones formarían estructuras tridimensionales del tipo “dedos de zinc”, a través de las cuales interactuarían con el ADN, Si bien el contenido total de protaminas (P1 y P2) con respecto a la cantidad de ADN es constante para todas las especies, la relación P1/P2 es variable (Bench *et al.*, 2000; Pradeepa y Rao, 2007).

Aparentemente esta relación está vinculada con el tiempo necesario para que pueda llevarse a cabo la descondensación nuclear. Aquellas especies que contienen P2 además de P1 parecerían descondensar el núcleo más rápido, sugiriendo que P1 y P2 difieren en el grado de estabilidad que confieren a la cromatina (Perreault *et al.*, 1987; Perreault, 1990).

2.4 Viabilidad de las células espermáticas

La viabilidad en este caso se define como el porcentaje de espermatozoides vivos en una fracción de la muestra de líquido seminal (Garner, 1997). Se realiza analizando la integridad de la membrana celular mediante fluorocromos combinados como las carboxifluoresceinas CFDA y el bromuro de etidio que se utiliza para teñir el núcleo de las células de color rojo cuando su membrana celular se encuentra dañada (Garner, 1997; Rodríguez, 2006; Cermeño, 2007; Retana *et al.*, 2007).

Otra forma de evaluar la viabilidad es utilizando colorantes vitales como la eosina en donde los espermatozoides teñidos de un color rojizo claro serán células muertas, en esta prueba se cuentan 200 células y se hace inmediatamente después de ser sometida a licuefacción la muestra por 30-60 min después de eyaculada (WHO, 1999; WHO, 2010). En el desarrollo experimental del presente proyecto, se siguió este método.

2.5 Daño del ADN espermático

El daño al ADN espermático se puede derivar de algunos factores que pueden producir daño irreversible como son: Generación de radicales libres de oxígeno, estrés oxidativo, empaquetamiento anormal de la cromatina (errores en la

sustitución de histonas por protaminas), deficiencias en la recombinación, apoptosis tras la salida del espermatozoide de los túbulos seminíferos. Causas externas que pueden provocar o potenciar los efectos anteriores como determinadas condiciones ambientales (contaminación, tabaquismo, temperatura testicular elevada) o patológicas (criptorquidia, varicocele, procesos inflamatorios o infección del tracto genital, cáncer, episodios febriles, estrés) (Morales et al., 2007).

El daño posttesticular durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo puede tener una participación importante en el origen de la fragmentación del ADN, este daño se ve reflejado más en el esperma epididimal caudal o eyaculado que en el esperma testicular. Estudios recientes muestran que los espermatozoides inmaduros que generan especies reactivas de oxígeno (ERO's) en niveles altos, pueden originar daño a los espermatozoides maduros y este daño se producirá después de la espermiación (Sakkas y Álvarez, 2011).

El daño al DNA espermático puede deberse tanto a daño directo de una molécula de anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o el óxido nítrico producidos por espermatozoides inmaduros o leucocitos o por la acción de las endonucleasas que se activan una vez iniciada la apoptosis regulando la sobreproducción y restringiendo la proliferación anormal durante condiciones inadecuadas para el desarrollo espermático y evitando que se sobrepase la capacidad de soporte que tiene la célula de Sertoli (Sakkas y Álvarez., 2011). Los espermatozoides que presentan un daño en el ADN pueden ser capaces de fertilizar un óvulo el cual puede desarrollar un embrión con anomalías genéticas o bien se produzcan abortos en cualquier etapa del embarazo (López et al., 1998).

En los últimos treinta años se han desarrollado nuevas metodologías para evaluar el daño al ADN que permiten medir roturas en cadena simple (SSB) y roturas en cadena doble (DSB), (tabla 1), Singh et al. (1988), desarrollaron una técnica capaz de medir niveles bajos de roturas en el ADN de células individualizadas. Esta metodología se basaba en resultados previos de Ostling y Johansson. (1984) que desarrollaron un método rápido y sensible para el análisis de daño al ADN adoptando la palabra "cometa" pues la morfología que

mostraban las células con su ADN dañado era igual a la de un cometa (Zúñiga, 2009).

2.6 Ensayo cometa

El ensayo cometa (electroforesis de célula individual en gel) (Ostling y Johansson, 1984), se utiliza para evaluar el daño en el ADN en células individuales, es sensible y rápido. Mediante este ensayo se detectan roturas en la cadena simple o doble de ADN sometiendo a electroforesis y midiendo la migración de la molécula de ADN rota hacia el ánodo, para lo cual las células son embebidas en una matriz inerte de agarosa sobre un portaobjetos y se lisan con detergentes y sales de alta concentración, resultando en núcleos desproteinizados (al romper los puentes disulfuro con agentes como el ditiotreitól, el ADN quedará sin protaminas e histonas, dejando a la molécula descompactada), es decir en nucleoides (Enciso et al., 2009).

Existen dos técnicas para realizar el ensayo, la primera es el ensayo cometa neutro a (pH=8,4), en el cual el ADN migra bajo condiciones neutras mostrando las fragmentación del ADN de doble cadena. La segunda técnica es el ensayo cometa alcalino a (pH=13) en el cual el ADN migra bajo condiciones alcalinas en el cual se detecta la fragmentación del ADN de cadena simple ya que el ADN es desnaturalizado. La longitud de la cola del cometa en relación a la cabeza refleja el número de rompimientos de la molécula de ADN (Enciso et al., 2009).

El trabajo realizado por Enciso et al. (2009) muestra un ensayo cometa de dos colas en espermatozoides de humano, la muestra embebida en agarosa es sometida a electroforesis con pH neutro para detectar roturas de cadena doble y a pH alcalino para detectar roturas de cadena sencilla utilizando al DTT (ditiotreitól) como agente para romper los puentes disulfuro y así descompactar la molécula de ADN.

Cuando el ADN pierde su superenrollamiento a bajas concentraciones de genotóxicos o cuando sufre la fragmentación del ADN con niveles altos de genotoxícos, se observa en las células dañadas una mayor fluorescencia en la cola en relación a la cabeza (fig. 2) (Enciso et al., 2009).

Tabla 1. Métodos utilizados para evaluar alteraciones en el DNA de espermatozoides, así como de algunas de sus ventajas e inconvenientes en relación con la aplicación clínica de rutina

<i>Métodos que se basan en el marcaje de roturas del DNA</i>				
Método	Instrumental	Ventajas	Desventajas	Utilidad clínica
TUNEL	Microscopio fluorescencia Citometría de flujo	Cumple con parámetros de control de calidad	Equipo sofisticado y costoso	Fertilidad masculina Reproducción asistida Perdidas fetales
ISNT	Microscopio fluorescencia Citometría de flujo	Reacción de marcaje directo	Equipo sofisticado y costoso	Fertilidad masculina
<i>Métodos que se basan en la susceptibilidad del DNA para desnaturalizarse</i>				
SCSA	Citometría de flujo	Punto de corte establecido (30%) para diferenciar pacientes fértiles e infértiles	Instrumentación costosa y capacitación técnica	Recomendada en estudios epidemiológicos de fertilidad
COMETA	Microscopio fluorescencia Electroforesis DNA	Bajo costo	Lento de ejecución Requiere observador con experiencia	Fertilidad masculina Reproducción asistida Criopreservación de esperma
SCD	Microscopio fluorescencia campo claro	Análisis simple de resultados Bajo costo	Aún no determinada	Aún no determinada ¿Varicocele?
DBD-FISH	Microscopio fluorescencia	Revela modificaciones estructurales de la cromatina	Procedimiento sofisticado y costoso	Aún no determinada
Otros métodos				
NA	Microscopio fluorescencia Citometría de flujo	Bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Diferencias significativas en patologías andrológicas
AT	Microscopio campo claro	Método simple y de bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Evaluación de anomalías en la cromatina
CMA	Microscopio fluorescencia	Método simple y de bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Evaluación de anomalías en la cromatina

TUNEL: terminal dUTP Nick-end Labeling. ISNT: In situ Nick Translation. DBD-FISH: DNA Breakage Deletion-Fluorescence In situ Hybridization. SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay. SCD: Sperm Chromatin Dispersión. NA: Naranja de Acridina. AT: Azul de Toluidina. CMA: Cromomicina (Cortéz *et al.*, 2007).

Como un ensayo de genotoxicidad, el ensayo cometa puede identificar posibles agentes mutágenos que se utilizan cotidianamente y agentes antineoplásicos que pueden dañar al ADN espermático de humanos (Larrea, 2007).

El fundamento de la técnica consiste en lisar células de interés embebidas en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, mediante detergentes y altas concentraciones de sal, de esta forma se libera el ADN superenrollado en forma de nucleoides y posteriormente estos nucleoides serán sometidos a la acción de un campo eléctrico a pH alcalino (Larrea, 2007; Poletta, 2011). Durante esta acción (electroforesis) el ADN será atraído hacia el ánodo y para que exista

DETECCION DE DAÑO GENÓMICO EN GAMETOS MASCULINOS HUMANOS MEDIANTE ELECTROFORESIS UNICELULAR ALCALINA (ENSAYO COMETA)

movilidad se debe de presentar roturas en el ADN generando pequeños fragmentos que darán origen a pequeños cometas (Fig. 2) (Larrea, 2007; Poletta, 2011).

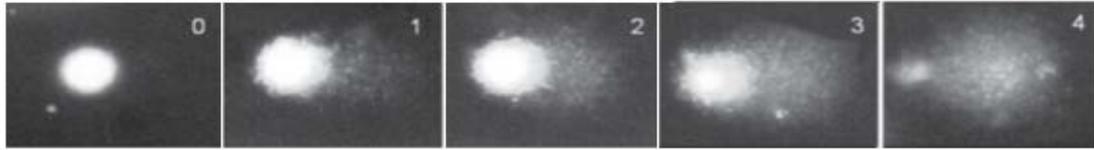


Fig. 2. Fotomicrografías de la morfología de los núcleos en cinco categorías 0) sin daño en el DNA, 1) daño bajo, 2) daño medio, 3) daño alto 4) daño total (tomado de Collins, 2004).

El largo del cometa se incrementa de acuerdo al daño que se presenta en la cadena de ADN y la capacidad del ADN de migrar hacia el ánodo va a depender del tamaño del fragmento generado por la lesión, (Fig. 2) por medio de una coloración se puede observar el daño (Larrea, 2007).

El ensayo es sensible para detectar bajos niveles de daño en el ADN de diferente naturaleza como roturas de cadena sencilla y doble, bases oxidadas, uniones ADN-ADN y ADN-proteínas, esta técnica es de rápida realización (resultados en pocos días), flexibilidad y bajo costo en comparación con técnicas como FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) (Tice et al., 2000; Arencibia et al., 2003; Collins, 2004). Sin embargo, una limitación de la técnica es que no detecta agentes aneugénicos ni efecto en los “check-point” del ciclo celular, alteraciones que han sido descritas como posibles precursores de mecanismos asociados al proceso carcinogénico (Collins, 2004; Speit y Hartmann., 2006; Poletta, 2011).

Para aumentar la sensibilidad del método propuesto por Singh *et al.*, (1988). Se han realizado varias modificaciones, ya sea para detectar mejor los rompimientos de la cadena sencilla del ADN o los sitios sensibles a un medio alcalino. Dentro de las variables que afectan la sensibilidad se encuentran, la concentración de la agarosa, la composición de la solución de lisis, la composición y pH del amortiguador de electroforesis, condiciones de la electroforesis como el voltaje, corriente y duración (Cortes, 1997).

2.7 Ensayo cometa en espermatozoides de humanos

Debido a que los espermatozoides humanos presentan en particular un ADN muy compactado por las protaminas, Enciso *et al.* (2009) aplica un ensayo cometa de dos colas.

En realidad este ensayo es una adaptación de la electroforesis de ADN desnudo, comúnmente utilizada en biología molecular, al campo de la biología celular. La idea es que el DNA de un núcleo desproteínizado que contenga roturas en sus cadenas de DNA, estará más libre para ser movilizado hacia el polo positivo, cuando éste se someta a un campo eléctrico. La metodología consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfhidrilo que se encuentran en la protaminas (ricas en cisteína y arginina) del espermatozoide, como por ejemplo DTT (dithiothreitol) (Cortéz *et al.*, 2007). Esta metodología fue aplicada por Enciso *et al.* (2009) la cual realizó en una sola lámina el ensayo cometa a condiciones de pH alcalino y a condiciones de pH neutro para obtener los dos tipos de daño en el ADN (roturas de cadena sencilla y de cadena doble).

Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sustancias fluorescentes del tipo DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole), IP (Ioduro de Propidio) o SYBR-GREEN (Synergy Brand), (Cortéz *et al.*, 2007). De acuerdo con Gallegos *et al.* (2008) en nuestro estudio los hombres con parámetros de mala calidad en semen son más propensos a mostrar una mayor proporción de espermatozoides con ADN fragmentado, que los hombres con parámetros seminales normales, al igual que los varones con cierta patología andrológica como las infecciones, varicocele e infertilidad (Enciso *et al.*, 2006).

Muchos estudios sugieren que la fragmentación del ADN de los espermatozoides podría influir en la calidad de fertilización y el desarrollo del embrión (Enciso *et al.*, 2009). El objetivo de los trabajos de Enciso *et al.*, (2009) fue realizar un ensayo bidimensional para observar los dos tipos de roturas ya que en la misma célula se pueden estar presentando roturas de cadena simple y doble (Fig. 3).

Los resultados obtenidos en el ensayo de dos colas fueron utilizados para la observación de la efectividad de dos técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) para seleccionar aquellas células que poseen el ADN íntegro y desechar las que tienen el ADN fragmentado (Enciso *et al.*, 2011). Lo cual nos da un panorama amplio para poder aceptar este método como una herramienta de diagnóstico y selección de células de buena calidad con ADN íntegro.

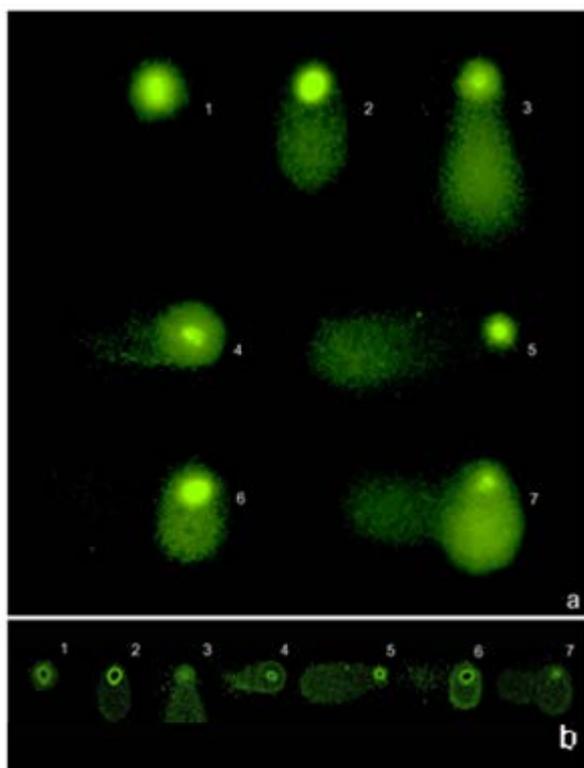


Fig. 3. Ensayo cometa en dos dimensiones (2D) en espermatozoides humanos. Tipos de espermatozoides obtenidos cuando una muestra se procesa con el ensayo cometa 2D: 1, espermatozoide sin roturas; 2, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena sencilla; 3, espermatozoide con un nivel alto de roturas de ADN de cadena sencilla; 4, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena doble; 5, espermatozoide con un nivel alto de roturas de ADN de cadena doble; 6, espermatozoide con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena sencilla y doble; 7, espermatozoide con un nivel alto de roturas de ADN de cadena sencilla y doble. (a) 7 tipos de cometa 2D teñidos con Sybr Green. (b) las mismas imágenes después de la aplicación de un filtro digital (Enciso *et al.*, 2009).

2.8 Fragmentación del ADN espermático y su relación con la fertilidad

Dado que la transmisión de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al ovocito es esencial para la consecución y desarrollo del embarazo, su rotura podría conllevar alteraciones en la fertilización y desarrollo embrionario consiguiente (Morales *et al.*, 2007).

Por ello, en los últimos años se está proponiendo como causa probable de infertilidad y esterilidad, el daño del ADN espermático, y de ahí el interés en

desarrollar técnicas analíticas encaminadas a medir la fragmentación del ADN espermático, e incluirlas en el estudio del factor masculino (Morales *et al.*, 2007).

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 un mayor porcentaje de espermatozoides con roturas en el ADN (Saleh *et al.*, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

Dado que el análisis seminográfico solo proporciona un panorama general de la calidad seminal y capacidad del espermatozoide para poder fertilizar el ovulo, y no considera la integridad del ADN espermático, se requiere de una prueba adicional que pueda detectar el daño generado directamente en el ADN. Daño que puede ser inducido por diferentes agentes tanto internos (varicocele) como externos (contaminación ambiental, exposición laboral, médica o accidental a agentes químicos, hábitos personales, etc.), es importante realizar el análisis de la fragmentación del ADN, mediante un ensayo reproducible, como la electroforesis unicelular en gel de agarosa (EUG), con miras a que se establezca como método clínico de rutina, ya que el ADN no es responsable de la capacidad fertilizante de los gametos pero si de transmitir la información genética a la descendencia y las consecuencias que esto implica.

4. HIPÓTESIS

En estudios andrológicos en los que se realizan ciertas técnicas moleculares que determinan el daño en el ADN espermático, se observa que la calidad de los espermatozoides, integridad del ADN y la fertilidad en humanos puede estar asociada a procesos de fragmentación del ADN espermático, por lo que al evaluar el daño al ADN de hombres en etapa reproductiva con calidad seminal disminuida (no estándares), o que presente algún tipo de enfermedad como los sobrevivientes de cáncer, o infértiles, se observara mayor fragmentación del ADN espermático.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo General*

5.1.1 Determinar el daño en el ADN genómico de espermatozoides de hombres con calidad seminal disminuida, infértiles y tratados con antineoplásicos mediante electroforesis unicelular alcalina.

5.2 *Objetivos Particulares*

5.2.1 Establecer la calidad seminal mediante espermatobioscopia directa de donadores sanos, infértiles y tratados con antineoplásicos basados en los valores estándares de la OMS (1999; 2010).

5.2.2 Determinar el Índice de Fragmentación del ADN (IFA) de los individuos antes mencionados mediante electroforesis unicelular alcalina.

5.2.3 Establecer la relación entre calidad seminal y el IFA de los individuos sanos, con calidad seminal disminuida, infértiles y tratados con antineoplásicos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Evaluación de calidad espermática

Se realizó espermatobioscopia directa a 40 muestras de líquido seminal de hombres entre 18 y 25 años de edad, evaluando los parámetros físicos (pH, volumen, viscosidad, color) y citológicos (densidad, morfología, viabilidad y progresión) de acuerdo a los estándares propuestos por la WHO (1999) y como límites inferiores de referencia los de 2010 (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de referencia de calidad seminal de la WHO (1999) y (2010).

	1999, 4 ^{ta} edición ³	2010, 5 ^{ta} edición ⁴
	Valor de referencia	Límite inferior de referencia, LRL
Licuefacción	Total a los 60 min	Total a los 60 min
pH	7,2-7,8	≥7,2
volumen	2,0 mL	1,5 mL (1,4-1,7)
Concentración espermática	20 x 10 ⁶ /mL	15 x 10 ⁶ /mL (12-15)
Concentración total	40 x 10 ⁶	39 x 10 ⁶ (33-46)
Motilidad total (progresivos + no progresivos)	No detallada	40% (38-42)
Motilidad progresiva	50%	32% (31-34)
Viabilidad	75%	58% (55-63)
Formas normales	15%	4% (3-4)
Leucocitos	< 1 x 10 ⁶ /mL	< 1 x 10 ⁶ /mL
Mar test	< 50 % esp. unidos a partículas	< 50 % esp. unidos a partículas
"Immunobeads"	< 50 % esp. unidos a partículas	< 50 % esp. unidos a partículas

Límites inferiores para cada parámetro seminal (Sarabia y Munuce, 2011).

6.2 Criterios de inclusión y exclusión

Los individuos debieron contar con 3-5 días de abstinencia sexual, no haber presentado síntomas febriles en los últimos tres meses, no estar vasectomizados, proporcionar datos (cuestionario) sobre hábitos personales (fumar y beber alcohol), así como consentimiento informado.

6.3 Tamaño de la muestra

Se utilizaron 7 muestras seminales de individuos clínicamente sanos (sin enfermedades crónico degenerativas) y estándares según la WHO (1999; 2010), para generar el control positivo, 13 muestras seminales de individuos clínicamente sanos y estándares, 10 muestras de clínicamente sanos no estándares, 8 muestras de individuos con problemas de fertilidad no estándares

según la WHO (1999; 2010), y 2 muestras de sobrevivientes a cáncer de edades entre 18 y 25 años.

6.4 Ensayo cometa

Los portaobjetos fueron lavados exhaustivamente con agua, desengrasados con metanol/etanol y secados al aire. Se les colocó una capa de agarosa regular (1% Sigma) y se promovió su gelificación en una placa fría.

Se generó el control positivo tratando las muestras seminales de jóvenes clínicamente sanos, infértiles y sobrevivientes a cáncer con edades entre 18 y 25 años con H₂O₂ (0.3%) a temperatura ambiente por 30 minutos (Enciso *et al.*, 2009).

Los espermatozoides se diluyeron a una concentración de 10x10⁶ espermatozoides/ml en buffer de fosfato salino y centrifugados para remover el líquido seminal y nuevamente se resuspendió el botón celular en PBS y 25 µl de la dilución celular se mezclaron con 50 µl de agarosa de bajo punto de fusión (37°C) (1%) recién preparada. Se colocaron 15µl de la mezcla en portaobjetos pre-tratados para facilitar la adhesión del gel, se cubrieron con cubreobjetos y se colocó en una placa fría.

Tan pronto como solidificó el gel se retiró el cubreobjetos y se sumergieron las láminas secuencialmente en dos soluciones de lisis. Solución de lisis 1: Tris-HCl, DL-ditiotreitol (DTT) y dodecil sulfato sódico (SDS) a pH 7.5 durante 3 horas y 2: Tris-HCl, NaCl, SDS y EDTA a pH 7.5 durante 3 horas.

Las láminas se enjuagaron por 10 min en buffer de TBE (Tris-borato EDTA a pH 7.5 y se lavaron en 0.9% NaCl. Los nucleoides fueron desenrollados en una solución alcalina de NaOH y NaCl durante 2.5 minutos.

6.5 Electroforesis

Las láminas se colocaron en una cámara para electroforesis con una solución amortiguadora a pH alcalino cubriéndolas completamente ajustando la fuente de poder a 20V, 300 mA durante 18 min (en oscuridad total). Se enjuagaron las láminas en un buffer de neutralización de Tris-HCl a pH 7.5 durante 5 min, posteriormente se lavaron brevemente en buffer de TBE (Tris-borato EDTA).

Las láminas se deshidrataron en etanol en una caja coplin durante 5 minutos y se dejaron secar al aire.

6.6 Tinción y lectura de las láminas

Las láminas fueron teñidas con 50 µl de Bromuro de etidio 1X, durante 5 minutos y se cubrieron cuidadosamente con un cubreobjetos (se realizó este procedimiento en la oscuridad).

Las láminas se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon 80i Eclipse) con un filtro de excitación/emisión de 515-560 nm utilizando un aumento de 40X para visualizar y 100X para medir con un ocular graduado y calibrado, se midió el diámetro del núcleo y la longitud de la estela del cometa de 300 células por lamina/individuo.

Se categorizaron los cometas de acuerdo al promedio de la longitud del nucleoide donde $r =$ a la longitud de la estela/medida de la cabeza del cometa (Altamirano *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2003) donde $r=0$ fueron considerados **sin daño (a)**; cuando r fue ≤ 1 fueron considerados como **daño bajo (b)**; cuando r fue ≤ 2 en **daño medio (c)**; si r fue > 2 se consideró como **daño alto (d)**; los núcleos donde el ADN migro completamente fuera de la región del nucleoide se consideraron como **daño severo (e)**, con estos datos se determinó el índice de migración (IMg).

$$IMg = \frac{(a)1 + (b)2 + (c)3 + (d)4 + (e)5}{100\% \text{ de células analizadas}}$$

Donde (a), (b), (c), (d) y (e) son porcentajes de núcleos en las categorías y 1, 2, 3, 4 y 5 los valores que representan cada categoría.

6.7 Análisis Estadístico:

Se aplicó la prueba de “**t**” de Student para comparar los grupos de los donadores estándares vs donadores con baja calidad seminal (no estándares, sobrevivientes de cáncer e infértiles) y para contrastar los Índices de migración se aplicó una prueba de rangos para muestras independientes (**U de Mann Whitney**), para determinar diferencias estadísticas en la longitud de migración de ADN se realizó un análisis de varianza ANDEVA seguido de una prueba de

TUKEY, se usó la prueba de **Z** para proporciones para los datos que se representan en porcentaje de las células con daño en ADN espermático y el IFA.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis seminográfico

Todas las muestras de líquido seminal analizadas tuvieron parámetros físicos donde el pH fue de 8.0 y solo en cuatro muestras el pH sobrepaso los estándares, casi un 50% de las muestras tuvieron una viscosidad normal, cerca del 65% un color normal y más del 90% un volumen dentro del estándar.

Se consideraron los parámetros citológicos de densidad y morfología para definirlos como estándares (NL) o no estándares (NN) de acuerdo con la WHO (1999; 2010) para cada una de las muestras; donde las 13 muestras (NL) tuvieron una densidad normal (90.9 ± 5.2) $\times 10^6$ espermatozoides/ml fig. 4A, y una morfología de (37.6 ± 1.2) % de células normales fig. 4B. Las muestras (NN) tuvieron una densidad de (10.78 ± 0.21) $\times 10^6$ espermatozoides/ml fig. 4A, y morfología de (11.5 ± 0.15) % de células normales fig. 4B, tabla 3.

Las muestras de individuos infértiles se clasificaron de la misma manera que los NN y los valores donde la densidad fue de (8.00 ± 0.15) $\times 10^6$ espermatozoides/ml fig. 4A y una morfología de (9.25 ± 0.34) % células normales, fig. 4B, tabla 3. Solo una muestra contaba con valores de densidad y morfología por encima de los límites inferiores dados por la WHO (1999).

Las muestras de líquido seminal de sobrevivientes a cáncer (E.H.) mostraron una densidad normal de (90.6 ± 6.3) $\times 10^6$ espermatozoides/ml fig. 4A y una morfología de (9 ± 0.25) % de células normales, fig. 4B; tabla 3.

Los datos de viabilidad y motilidad para las muestras NL fueron de (75.02 ± 0.49) % de células vivas fig. 4C; (63.4 ± 1.3) % de células progresivas fig. 4C, para NN de (58.69 ± 1.48) % de células vivas fig. 4C; (42.2 ± 2.9) % de células progresivas fig. 4D, para muestras infértiles de (46.5 ± 1.5) % de células vivas fig. 4C; (23.7 ± 0.69) % de células progresivas fig. 4d y muestras de sobrevivientes a cáncer (E.H.) de (71.37 ± 1.08) % células vivas fig. 4C; (67.02 ± 0.20) % células progresivas fig. 4D, tabla 3.

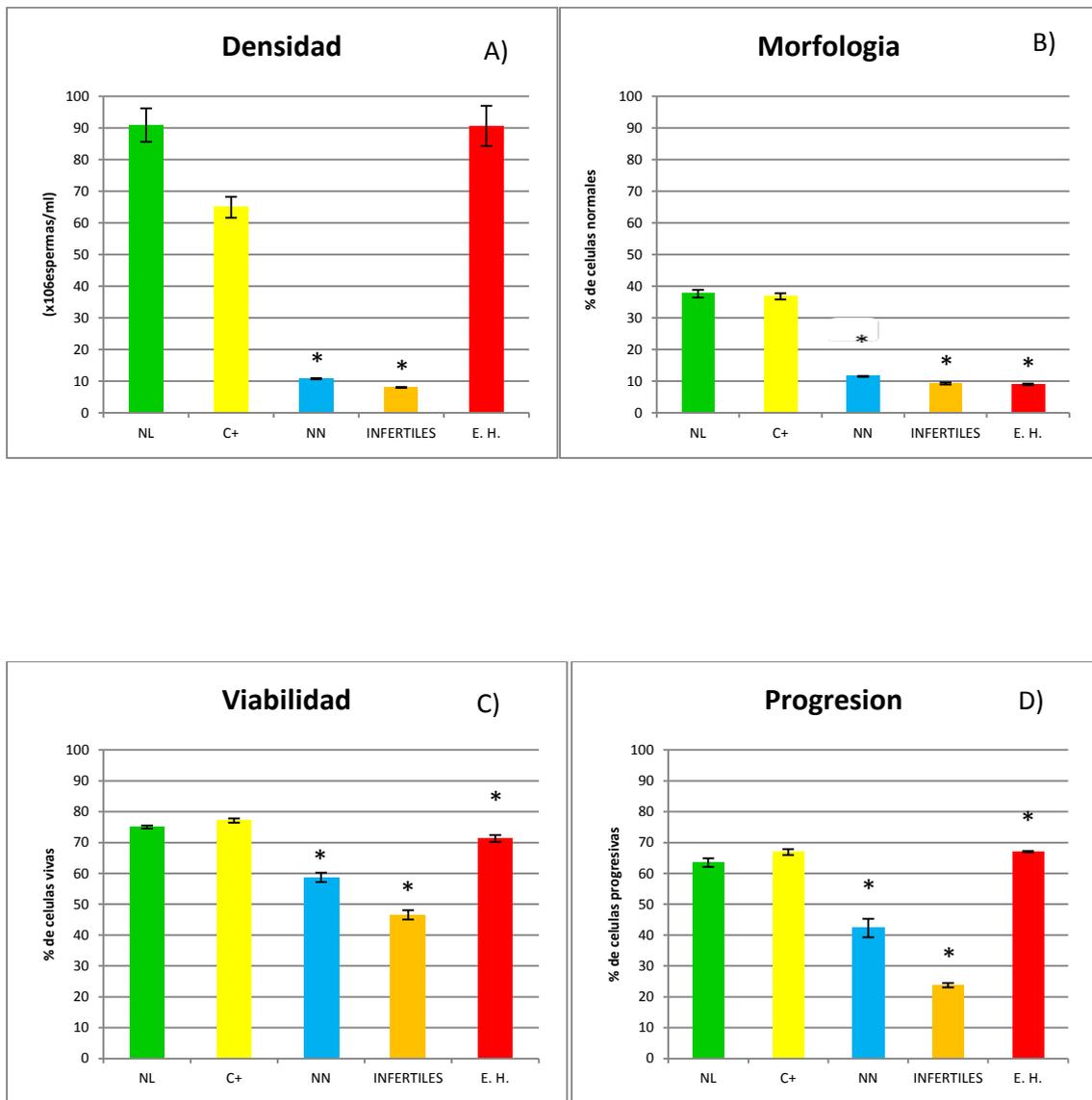


Fig. 4. Valores espermáticos citológicos representados en media con su error estándar de muestras NL (estándares), NN no estándares), infértiles, y EH (sobrevivientes de cáncer); A) valores de densidad, B) morfología, C) viabilidad, D) motilidad *P<0.05 grupos problema vs muestras normales (NL), prueba Z para proporciones.

Tabla 3. Parámetros citológicos donde se muestran las medias de cada grupo para cada valor

Valores	(OMS, 1999)	(OMS, 2010)	NL ($\bar{X} \pm eem$)	NN ($\bar{X} \pm eem$)	INFERTILES ($\bar{X} \pm eem$)	LINFOMA ($\bar{X} \pm eem$)
Concentración espermática ($\times 10^6$ espermias/mL)	20	15	90.9 \pm 5.2	10.78 \pm 0.21*	8.00 \pm 0.15*	90.6 \pm 6.3
Morfología (%)	> 15	> 4	37.6 \pm 1.2	11.5 \pm 0.15*	9.25 \pm 0.34*	9.0 \pm 0.25*
Viabilidad (%)	>75	>58	75.0 \pm 0.49	58.69 \pm 1.48*	46.5 \pm 1.5*	71.3 \pm 1.08*
Motilidad (%)	>50	>32	63.4 \pm 1.3	42.2 \pm 2.9*	23.7 \pm 0.69*	67.0 \pm 0.20*

NL, estándares; NN, no estándares; \bar{x} , Media; eem, error estándar de la media. VS con los datos de la WHO de (1999; 2010), * $P < 0.05$ grupos problema VS muestras normales (NL).

7.2. Ensayo cometa

El daño al ADN evaluado mediante el ensayo cometa se muestra en la fig. 5, las medias en cada uno de los criterios de evaluación longitud del cometa, el **IMg** (Índice de **Migración**), el porcentaje de células con daño y el IFA (Índice de **Fragmentación del ADN**) todos con error estándar se observan en la Tabla 4. Se puede apreciar que en todos los criterios de evaluación existe un incremento significativo de daño con una $p < 0.05$ para el IFA y longitud de daño espermático de todos los grupos de muestras, $p < 0.01$ para porcentaje de células con daño de sobrevivientes de cáncer, $p < 0.005$ para porcentaje de células con daño de muestras infértiles y no estándares, $p < 0.0005$ para IMg en los tres grupos de muestras, todas las muestras fueron comparadas con el grupo estándar (**NL**). En los individuos sobrevivientes a linfoma de Hodgkin (**EH**) la longitud del cometa fig. 7d1; d2, fue mayor que la de los grupos no estándares (**NN**) e infértiles fig. 5A. Para los datos de Índice de migración se observa un aumento significativo con una $p < 0.0005$ en los tres grupos problema comparándolos con el grupo estándar; el grupo de E.H. es el que presentó mayor IMg, seguido del grupo de los infértiles y el grupo no estándar fig. 5B.

El porcentaje de células con daño fig. 5C; tabla 4 mostró un comportamiento en el cual todos los grupos son significativamente mayores con una $p < 0.005$ para los grupos de muestras NN e infértiles que el grupo estándar, donde los infértiles tiene un mayor porcentaje de células con daño seguido del grupo no estándar y una $p < 0.01$ para el grupo de EH. El IFA de los grupos problema (baja calidad

seminal, sobrevivientes al cáncer e infértiles), presentó aumento significativo con $p < 0.05$, el grupo de infértiles fue el que presentó mayor IFA de $83.8 \pm 0.0\%$ fig. 5C, tabla 4, y los de baja calidad seminal o no estándares los que mostraron un IFA más pequeño de $51.6 \pm 1.2\%$. En general todos estos grupos presentaron un IFA $> 30\%$.

Se puede observar en la figura 5A y 5B el mismo comportamiento de daño al ADN pues en cada uno de los grupos el aumento en la longitud del cometa es notorio así como el IMg (índice de migración); el porcentaje de células con daño fig. 5C, refleja un comportamiento similar al del IFA, fig. 5D, y los resultados son significativamente más altos con una $p < 0.05$ comparados con el grupo estándar, es notable en ambos, que el grupo de E.H. presenta una disminución en comparación con los grupos de los Infértiles y no estándares, pues el grupo EH, presenta un porcentaje menor de células dañadas, pero con daño severo y teniendo un IFA significativamente más alto con una $p < 0.05$, que el grupo no estándar. Siendo el grupo de infértiles el que presento en longitud de fragmentación de ADN, IMg, IFA y porcentaje de células dañadas significativamente alto con $p < 0.05$, 0.01, 0.005 y 0.0005.

De las 10 muestras del grupo no estándar (NN), 4 tuvieron un IMg bajo así como el porcentaje de daño y longitud de los cometas mientras que en el grupo de infértiles una muestra resultó sin daño en el ADN espermático y con parámetros seminales normales. Ya que este ensayo solo determina las roturas de doble cadena seria de importancia buscar roturas de doble hebra que pudieran ocasionar la infertilidad o una prueba para la detección de posibles microdeleciones en el cromosoma Y.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo cometa de cada grupo de muestras fueron comparados con los datos de calidad seminal obtenidos mediante espermatobioscopia directa donde se observó que la longitud de los cometas fue significativamente mayor $p < 0.05$ en aquellos grupos que presentaron un porcentaje bajo de células normales, tales como son los grupos no estándares, infértiles y E.H. (sobrevivientes de cáncer) en comparación con el grupo estándar.

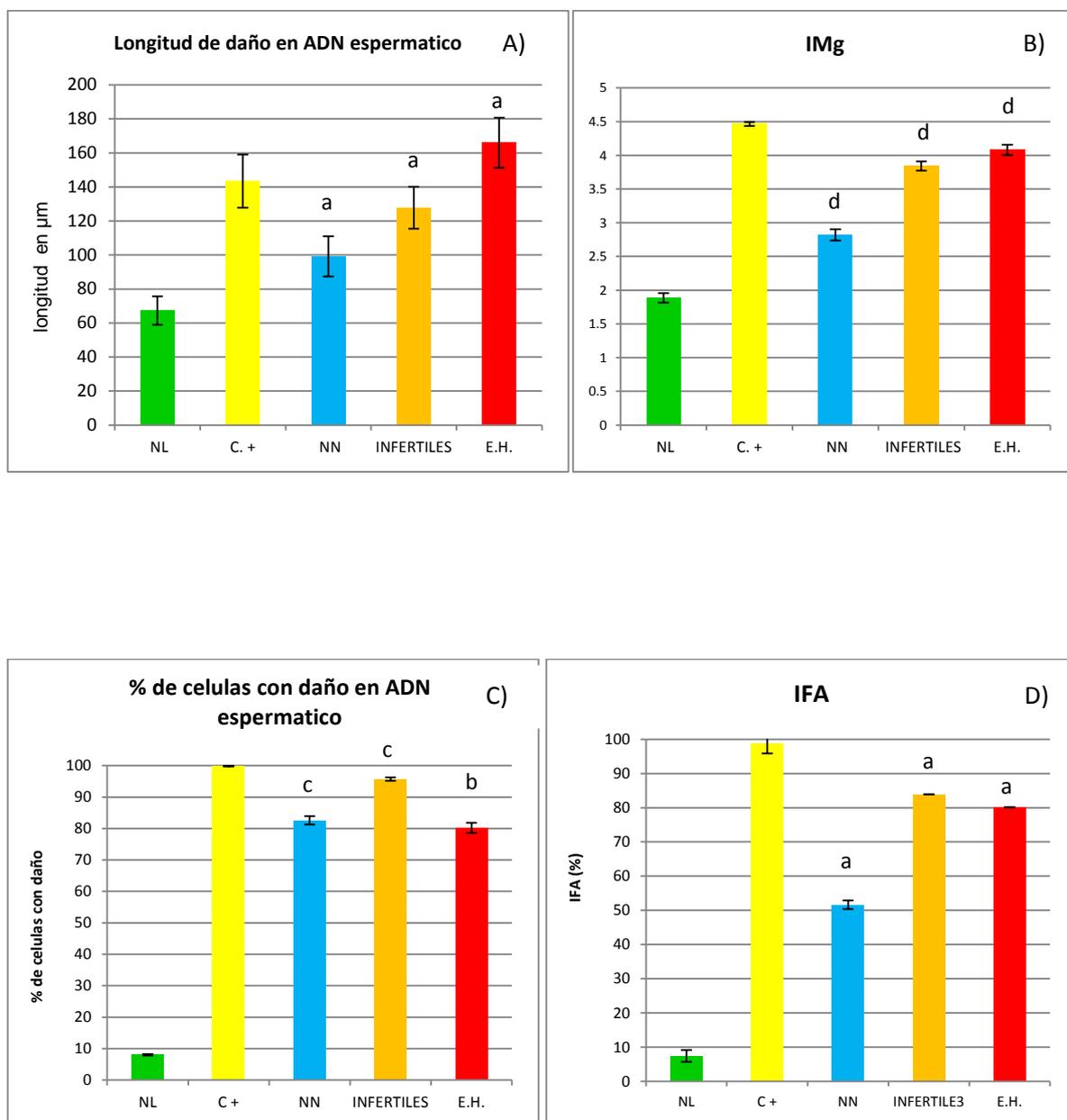


Fig. 5. Evaluación de daño en ADN espermático de muestras NN (no estándares), infértiles, E.H. (sobrevivientes a cáncer), A) Longitud de fragmentación del ADN espermático; B) IMg; C) porcentaje de células con daño; D) IFA (índice de fragmentación; ^aP<0.05, ^bP<0.01, ^cP<0.005, ^dP<0.0005 vs grupo estándar (NL) utilizando las pruebas de Análisis de Varianza, U de Mann Whitney, y prueba de Z para proporciones.

El grupo E.H. tuvo una longitud de ADN fragmentado significativamente aumentado de $165.98 \pm 0.84 \mu\text{m}$ con una $p < 0.05$ en relación al grupo estándar que fue de $67.27 \pm 0.53 \mu\text{m}$ fig. 7a, y en este grupo solo se observó un 9% de células normales valor que se encuentra por debajo del límite inferior según la WHO (1999), y por encima del límite inferior de la WHO (2010). En los grupos no estándares e infértiles aumento significativamente la longitud del ADN fragmentado fig. 5A, y su porcentaje de células normales fue bajo comparándolo solo con los valores dados por la WHO, (1999) tabla 3.

Se comparó la viabilidad con el Índice de Migración, donde todos los grupos presentaron aumento significativo en relación con el grupo estándar.

El grupo E.H. presentó un índice de migración mayor que el grupo estándar teniendo un $71.37 \pm 1.08\%$ de células vivas es decir normal comparado con datos de la WHO (2010), y con solo un 4% por debajo del de la WHO (1999) (tabla 3).

Tabla 4. Fragmentación de cadena sencilla (Medias \pm eem) de las muestras evaluadas mediante ensayo cometa en condiciones alcalinas.

Muestra	Longitud de cometa ($\mu\text{m} \pm \text{eem}$)	IMg ($\pm \text{eem}$)	Células con daño ($\% \pm \text{eem}$)	IFA ($\% \pm \text{eem}$)	n
NL	67.27 ± 0.53	1.89 ± 0.07	8.03 ± 0.26	7.4 ± 1.7	13
Control positivo	143.48 ± 0.8	4.5 ± 0.03	99.8 ± 0.01	98.7 ± 2.8	7
NN	$99.23 \pm 0.68^*$	$2.82 \pm 0.08^{****}$	$82.59 \pm 1.29^{***}$	$51.6 \pm 1.2^*$	10
Infértiles	$130.13 \pm 0.75^*$	$3.86 \pm 0.07^{****}$	$95.74 \pm 0.55^{***}$	$83.8 \pm 0.0^*$	8
E.H.	$165.98 \pm 0.84^*$	$4.08 \pm 0.07^{****}$	$80.2 \pm 1.61^{**}$	$80.16 \pm 0.0^*$	2

eem, error estándar de la media; IMg, índice de migración; IFA, índice de fragmentación del ADN; n, número de individuos analizados; EH (Enfermedad de Hodgkin) y/o sobrevivientes al cáncer; μm , micrómetros; NL, estándares; NN, no estándares. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, **** $P < 0.0005$, grupos problema VS muestras normales (NL).

El grupo de no estándares presentó un índice de migración de 2.82 ± 0.08 y un porcentaje de células vivas bajo según parámetros de la WHO (1999) y un porcentaje de células vivas casi igual con el límite inferior de la WHO (2010). Siendo el grupo de infértiles el que tuvo un índice de migración alto y viabilidad baja en comparación con los datos de la WHO (1999; 2010), tabla 3.

Se comparó también IFA con el aumento significativo del porcentaje de células progresivas, sólo dos grupos, no estándares e infértiles tuvieron un porcentaje por debajo de los límites inferiores dados por la WHO (1999; 2010) para el grupo E.H. la progresión tuvo un $67.0 \pm 0.20\%$ de células progresivas tabla 3.

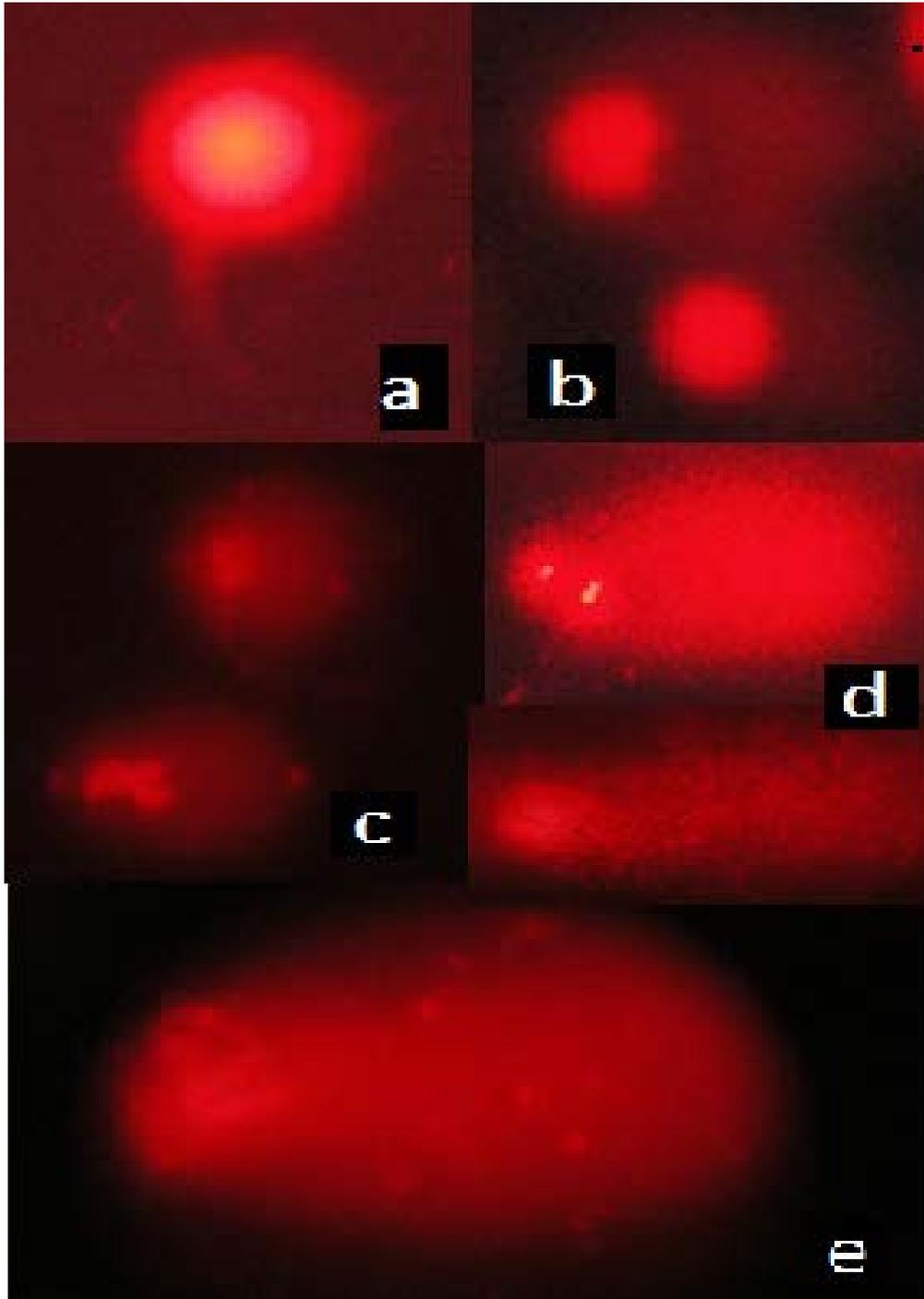


Fig. 6. Microfotografía de espermatozoides humanos con ensayo cometa que representa a) sin daño, b) daño bajo, c) daño medio, d) daño alto y e) daño severo teñidos con bromuro de etidio vistos a 100X en microscopio de epifluorescencia Nikon-Eclipse 80i a una longitud de onda de excitación/emisión de 515-560 nm.

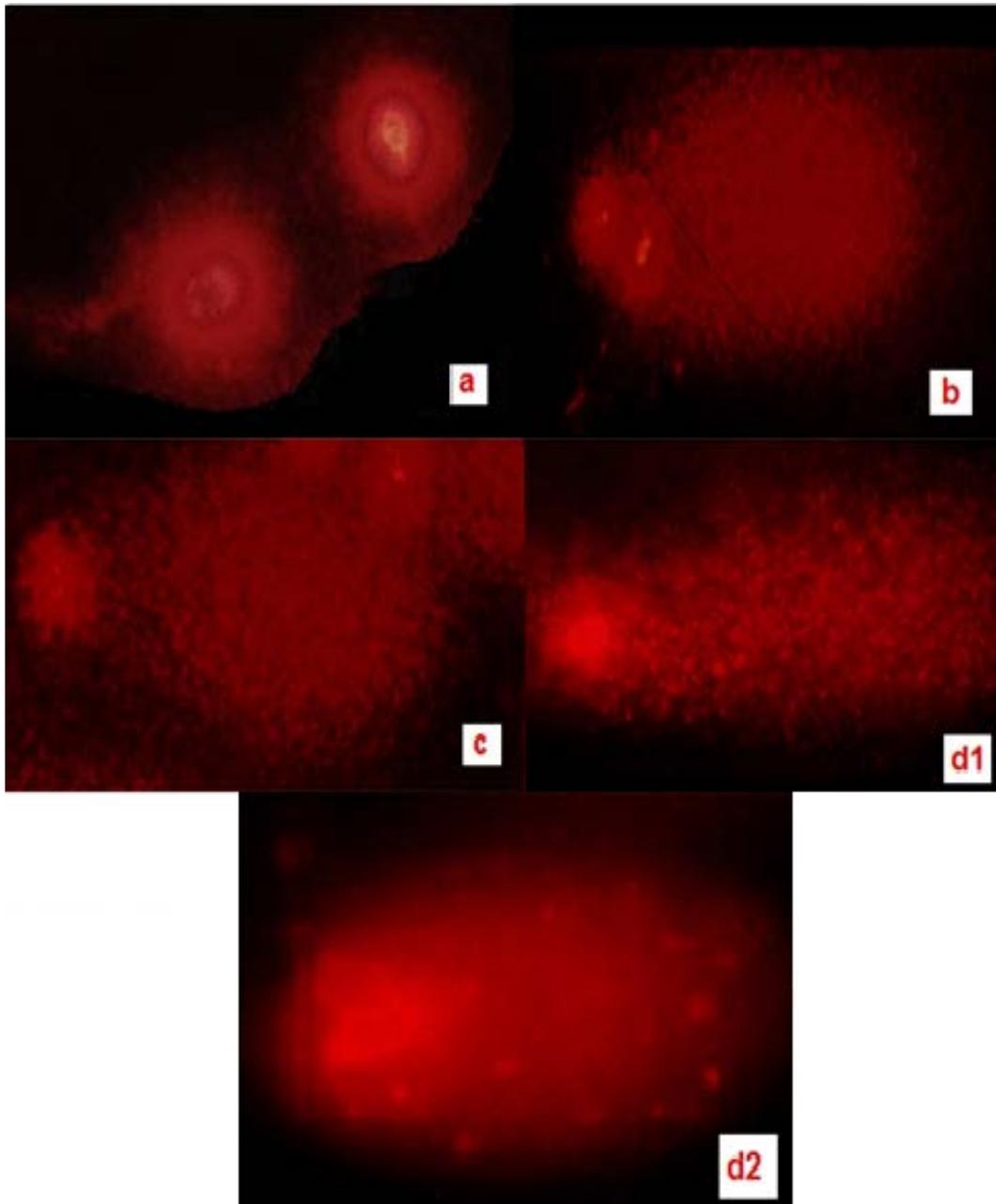


Fig. 7. Microfotografías de: a) espermatozoides con el ADN descondensado de una muestra estándar, b) cometa de una muestra no estándar, c) cometa de una muestra infértil, d1) cometa de una muestra de sobreviviente de cáncer, d2) nube de una muestra de sobreviviente de cáncer teñidos con bromuro de etidio vistos a 100X en microscopio de epifluorescencia Nikon-Eclipse 80i a una longitud de onda de excitación/emisión de 515-560 nm.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

8.1 Ensayo cometa y calidad seminal

La calidad seminal se puede determinar mediante espermotobioscopia directa, lo que implica una serie de valoraciones establecidas por la WHO. (1999, 2010), como el volumen del eyaculado, el pH, la concentración de espermatozoides (densidad), motilidad y morfología, dichos parámetros cuando se ven alterados, pueden estar relacionados con la fragmentación de ADN. (González y Rawe, 2010).

Aunque el análisis de calidad seminal es útil para la valoración del estado fértil de un paciente, tiene un valor limitado en el diagnóstico de la infertilidad masculina o predecir el éxito en la reproducción asistida (Simón *et al.*, 2013). Pues aunque los pacientes presentan espermogramas normales tienen problemas de infertilidad. La causa de la infertilidad puede ser debida a ADN espermático anómalo, 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 calidad fig., 8. (Agarwall y Allamaneni, 2005).

Aunque la densidad y la morfología son parámetros que van a determinar el estado fisiológico del espermatozoide, la viabilidad juega un papel importante en estas células para no dar un diagnóstico equivocado ya que el estado vital puede afectar de manera directa o indirecta a la población misma ya sea por producción normal de EROs para la capacitación espermática (O`Flaherty *et al.*, 2006) o peroxidación lipídica que conducen a muerte celular (Koppers *et al.*, 2011; Aitken *et al.*, 2012), así los espermatozoides muertos pueden producir EROs y propiciar fragmentación del ADN resultando un potencial reproductivo negativo (Portella *et al.*, 2013), lo cual podemos observar en las muestras de nuestro estudio la viabilidad del grupo NN se encuentra en los límites inferiores de la WHO (2010) y los del grupo infértil están por debajo de estos y con un índice de fragmentación de ADN espermático superior al 30% esto de manera natural o generado por los hábitos de vida, pues se observa que después del tratamiento con quimioterapia la viabilidad se recupera pero su ADN se encuentra fragmentado en porcentajes significativamente elevados, y como lo

demuestra Moskvtsev *et al.*, (2009) en un análisis seminal computarizado se correlaciona negativamente los parámetros de volumen seminal, concentración, motilidad, morfología y viabilidad espermática con el índice de fragmentación espermática, similar a lo que reporta Portella *et al.*, (2013) y que propone como modelo de estudio para predecir el IFA, resultados similares fueron observados en el presente estudio, donde disminuyó la viabilidad, la morfología y la motilidad en pacientes infértiles, lo que se relacionó con el aumento en la fragmentación del ADN. En el estudio de Cruz *et al.*, (2010) la correlación del IFA con la muerte celular y la permeabilidad a la eosina son positivas, en la que sugieren que la muerte celular es dada por la predisposición de la cromatina a ser degradada, idea que se apoya en el hecho de que el IFA detecta la susceptibilidad a la degradación del ADN y la muerte celular es una medida directa de la degradación. Así pues, las células muertas son susceptibles a ser degradadas porque tienen el ADN fragmentado y dado que las muestras de pacientes infértiles tienen el ADN fragmentado presentan un menor número de células viables. La migración de ADN incrementada señala fragmentación del mismo por generarse las EROs de espermatozoides en procesos de necrosis y apoptosis (Meinteires *et al.*, 2003). Estos afectarán entonces a los espermatozoides de alrededor, lo que no necesariamente pasa en las muestras de sobrevivientes a cáncer ya que su exposición a químicos durante la terapia generó muerte celular, que al momento del estudio se encontraba restablecida pero con el ADN altamente fragmentado.

Otro aspecto a considerar es la progresión del espermatozoide, la cual en el presente estudio representa en los grupos analizados una disminución en su porcentaje y en el cual se incrementa el daño en el ADN. Resultados similares fueron reportados por Cruz *et al.*, (2010), donde plantean el daño que sufren los espermatozoides durante su trayectoria desde el testículo hasta ser eyaculados.

Para poder observar la fragmentación del ADN espermático, es importante descondensar el ADN por lo que se requiere de agentes como el DL-DTT (ditiotreitól) para la eliminación de los puentes disulfuro. Ya que se está reconociendo que la integridad del ADN del espermatozoide es independiente de la calidad física del mismo y se ha demostrado que la calidad del ADN del espermatozoide puede afectar la fertilidad *in vivo e in vitro*; la infertilidad en

varones con parámetros seminales normales se relaciona con la presencia de ADN dañado en el espermatozoide (Agarwall y Allamaneni, 2005). En algunos pacientes infértiles, el control de la espermatogénesis puede ser menos eficiente y producir gran cantidad de espermatozoides inmaduros con restos citoplasmáticos que son propensos a producir especies reactivas de oxígeno y a su vez causar roturas de las cadenas de ADN (Gil *et al.*, 2001). Lo cual vemos reflejado en los resultados obtenidos en el presente estudio donde hay muestras no estándares que tienen el ADN fragmentado lo cual Gandini *et al.*, (2000), demostraron que un incremento de la fragmentación del ADN estaba relacionado con una disminución de la concentración espermática (densidad) y motilidad, además las muestras infértiles refuerzan lo demostrado en las que también se observa una calidad seminal baja y tienen el ADN fragmentado.

El ensayo cometa ha sido utilizado durante años para detectar daño en el ADN y donde se pueden utilizar un pequeño número de células y los datos pueden ser trabajados de manera individual (Collins *et al.*, 1997). El ensayo cometa mostro un panorama amplio de la relación que existe entre la fragmentación del ADN espermático y la baja calidad seminal así como una relación con la infertilidad. En el caso de la infertilidad, los resultados en este estudio muestran que el daño va de alto a severo. Para los enfermos de Hodgkin (EH) es severo.

Un empaquetamiento defectuoso de la cromatina se correlaciona con una tasa baja de fertilización, tras fecundación *in vitro* (FIV) o inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) (López *et al.*, 1998; Esterhuizen *et al.*, 2000) y con una incidencia más alta de abortos (Evenson *et al.*, 1999). Las rupturas de cadena sencilla se presentaron en los tres grupos, muestran un IFA por encima del 30% con porcentajes de motilidad, morfología y concentración espermática bajos.

Se seleccionó el ensayo cometa alcalino debido a que es una técnica cuya realización implica un tiempo corto, desarrollo relativamente sencillo, puede realizarse en cualquier tipo de célula y porque es muy sensible para la detección del daño en ADN (Irvine *et al.*, 2000; Villani *et al.*, 2010; Simón *et al.*, 2011). La mayoría de trabajos en andrología realizados en España son enfocados en el humano ya que se demuestra que la baja calidad seminal e infertilidad, es un

factor resultante de daño en el ADN espermático, daño que al momento de realizar un análisis rutinario para definir la calidad seminal no es posible detectar.

Enciso *et al.*, (2009; 2011), han realizado trabajos para la detección de daño en los espermatozoides mediante el ensayo cometa y otras pruebas donde se ha demostrado que existe relación entre la fragmentación del ADN espermático y los bajos porcentajes de células móviles. En dos técnicas realizadas en la reproducción asistida (centrifugación en gradiente de densidad y la *swin-up*), los espermatozoides que no presentaban condiciones óptimas para la selección por medio de estas dos técnicas presentaban un ADN fragmentado, demostrando que las dos técnicas utilizadas en reproducción asistida son eficaces para excluir aquellas células que tienen comprometido el ADN (Enciso *et al.*, 2011). El presente estudio refleja que el bajo porcentaje de células normales y progresivas tienen un ADN dañado en los tres grupos, el estudio puede reforzar a las técnicas ya aplicadas en clínica para excluir a las células que presentan daño.

El mecanismo más importante de producción de daño en el ADN del espermatozoide puede ser la presencia de un empaquetamiento anómalo de la cromatina, debido a una protaminación insuficiente, por producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y apoptosis (Sakkas *et al.*, 1999; Shen y Ong 2000). Se presenta una relación entre la fragmentación del ADN espermático y la presencia de protaminas P1 y P2 alteradas (Peiro, 2012). Lo que explica los resultados en el grupo de muestras no estándares e infértiles, ya que los espermatozoides del grupo NN presentan un porcentaje bajo de células normales y un alto porcentaje de células con daño que pudo deberse a el mal empaquetamiento y protaminas con defectos.

Existe una relación entre el daño en el ADN espermático, la calidad seminal y la fertilidad masculina, por malos resultados en las técnicas de reproducción asistida donde se incluyen la tasa de fertilización antes y después de la implantación, y el desarrollo del embrión (Evenson *et al.*, 1980; Hu *et al.*, 1998; Mahfouz *et al.*, 2010; Avendaño y Oehninger 2011; Simón *et al.*, 2011). Saleh *et al.*, (2002) demostró que hombres con parámetros seminales normales clasificados como idiopáticos tuvieron un alto porcentaje de espermatozoides con daño en el ADN, cuando se compararon con hombres con fertilidad

comprobada con parámetros seminales normales. Mismo que se puede observar en el estudio que se realizó, ya que en el grupo de muestras de individuos infértiles, una muestra cuenta con una calidad espermática normal y no presenta un alto porcentaje de células con daño en el ADN de cadena sencilla y que puede considerarse como idiopáticos. Estos pueden tener un ADN con rupturas de cadena doble, o bien, alguna delección en el cromosoma Y en una zona que se le denomina AZF (factor azoospermico), el cual puede causar azoospermia no obstructiva hasta una oligozoospermia severa. Estas microdeleciones conducen a disfunción de genes importantes en la espermatogénesis que causan con frecuencia la infertilidad (Poirot y Cherruau, 2005). La infertilidad por microdeleciones en la zona AZF se confina a la región C que contiene al gen *DAZ* y que involucra un 13% de los hombres azoospermicos y 6% con oligozoospermia severa (Gorrita y Gorrita, 2013).

8.2. Cáncer, Infertilidad y fragmentación del ADN espermático

Se propone que el daño al ADN espermático es la causa de la infertilidad en un número sustancial de hombres, es el 50% de daño en el ADN espermático, el umbral donde los hombres con daño tienen menor probabilidad de lograr un embarazo por FIV, por lo cual los esfuerzos deben de enfocarse en averiguar las causas de infertilidad idiopática, con el fin de realizar un tratamiento adecuado (Simon *et al.*, 2013), ya que la capacidad de fertilización, la calidad del embrión y el desarrollo hasta blastocito se ven influenciados por la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado en la muestra (Agarwall y Allamaneni, 2004). Es así que, el desarrollo embrionario puede fallar en cualquier etapa o llegar a término con ciertas anomalías (Genesca *et al.*, 1992). Se ha demostrado que la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado es significativamente más alta en varones de parejas con abortos recurrentes comparados con la población general o con donantes fértiles (Carrell *et al.*, 2003). El presente estudio demostró que las muestras de individuos infértiles presentaron un IFA altamente significativo, y además su calidad espermática es baja, lo que significa que la fragmentación de ADN influye en la fertilidad, tal y como ya ha sido reportado (Prakash *et al.*, 1998; Hammadeh *et al.*, 2001; Michaeli *et al.*, 2004; Ricci *et al.*, 2009; Enciso *et al.*, 2011 y Simon *et al.*, 2013).

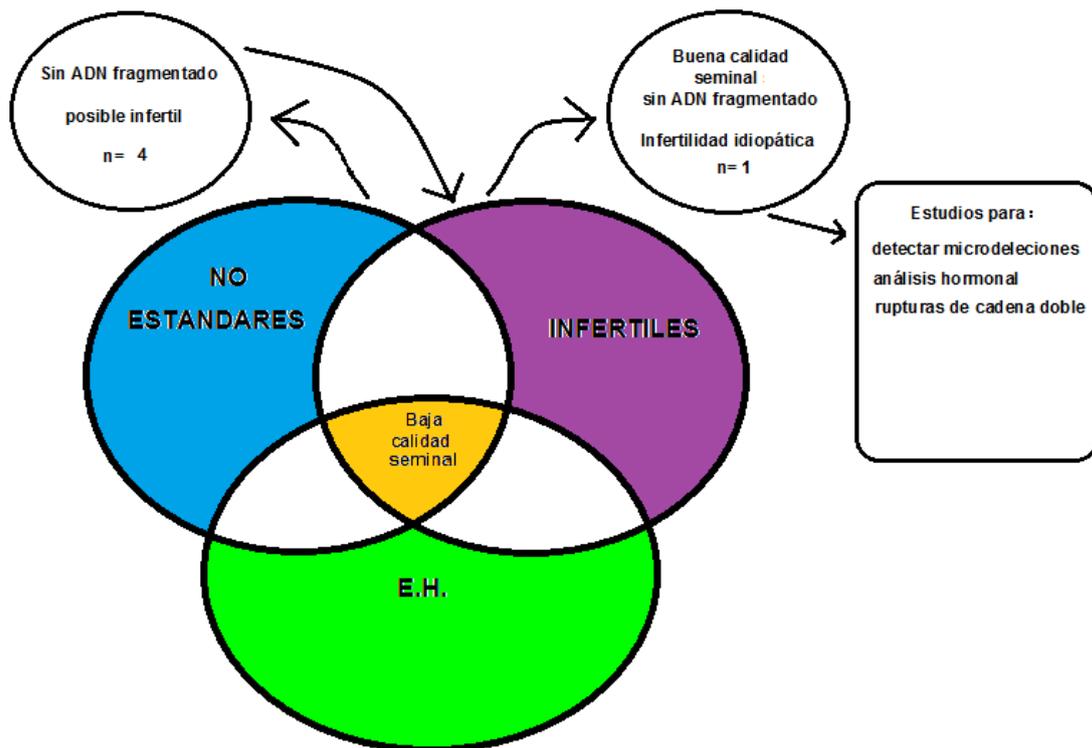


Fig. 8. Diagrama de la relación de baja calidad seminal de las muestras analizadas por ensayo cometa.

Ya que la calidad seminal y la fertilidad pueden verse disminuidas en los pacientes después del tratamiento, el riesgo a la infertilidad varía según la naturaleza del tratamiento, el tipo y los ciclos de quimioterapia, la zona de administración y la edad del paciente, hecho que se puede observar en el grupo de muestras de E.H. donde la progresión, viabilidad y densidad se recuperaron.

Los agentes alquilantes como ciclofosfamida o procarbasa son los que producen efectos importantes en la fertilidad masculina ya que puede haber detención en la espermatogénesis en la etapa de espermatogonia y que puede seguir el proceso al suspender el tratamiento aunque se podrían presentar alteraciones genéticas en cualquier etapa de la espermatogénesis (Málaga *et al.*, 2005; Casulo y Rich, 2014). Se observó en el presente estudio que las muestras de individuos con Hodgkin tuvieron un alto porcentaje de células con ADN fragmentado y un porcentaje bajo de células normales, con una concentración y viabilidad estándar lo que nos dice que se recuperó la concentración

espermática pero con daño en el ADN lo que causa infertilidad de manera momentánea o definitiva.

Las muestras que tienen un alto índice de fragmentación del ADN espermático que son de sobrevivientes a cáncer presentan una densidad alta de espermatozoides, lo que nos puede decir que su capacidad de recuperación para producir gametos es buena, pero estas células tienen su ADN dañado, lo que explica también que la morfología este por debajo del estándar, lo cual, en el futuro, si este daño no es reparado puede generar nuevas anomalías genéticas que pueden ser heredadas, bien el desarrollo embrionario se vea interrumpido, o el individuo se vuelva infértil, o se genere un síndrome (Málaga *et al.*, 2005).

La edad juega un papel importante para el riesgo que genera infertilidad por quimioterapia ya que pacientes mayores de 40 años tienen menor probabilidad de recuperar la fertilidad (ACS, 2014). Después del tratamiento la producción de espermatozoides se vuelve más lenta o se detiene definitivamente, dicha producción se da después de 1 a 4 años post tratamiento (ACS 2014). Procesos como varicocele o astenoteratozoospermia y la reorganización cromosómica tienen una relación alta con la fragmentación del ADN espermático (Peiro, 2012). Esto lo podemos observar en los resultados del estudio realizado pues los individuos tienen una edad promedio de 20 a 25 años y sus porcentajes de concentración espermática, progresión y viabilidad se encuentran dentro de lo estándar no así con la morfología, lo que también refleja el daño en el ADN, y que los individuos tuvieron buena recuperación en la producción de espermatozoides y que probablemente sean infértiles.

Se observan los efectos nocivos con el incremento en el porcentaje de daño en el ADN espermático en pacientes con cáncer testicular o linfoma de Hodgkin que fueron sometidos a quimioterapia. El ADN dañado en individuos que tuvieron cáncer puede alterar su capacidad de fertilidad (Flaherty *et al.*, 2011). Después de la quimioterapia el espermatozoides mantuvo un grado significativo de daño en la cromatina. Por lo tanto, los supervivientes de cáncer testicular y linfoma de Hodgkin tienen mayor riesgo de presentar daño reproductivo y mayor probabilidad de transmitirlo a sus descendientes.

Después de 24 meses de no tener quimioterapia, 57% de los pacientes con linfoma de Hodgkin, tuvieron concentraciones espermáticas normales, los cuales tienen riesgo de volverse subfétil y podrían procrear hijos sin conocer las potenciales consecuencias negativas del ADN espermático dañado en su progenie (Flaherty *et al.*, 2011). Los agentes químicos usados en la quimioterapia, y en específico en el tratamiento del linfoma de Hodgkin son el esquema AVBD (Adriamicyn, Vinblastina, Bleomicina, Dacarbazina), que son agentes de bajo riesgo y que en dosis bajas a moderadas se induce azoospermia temporal o permanente. Cuando se utilizan menos de 100 rads la recuperación testicular se da entre 9 a 18 meses, 30 meses para dosis de 200-300 rads y mayor o igual a 5 años para dosis de 400-600 rads. La esterilidad permanente se observa en dosis únicas con 600 a 800 rads (Martín y Campana, 1993). También se puede causar daño al ADN aunque los individuos pueden recuperar sus parámetros seminales, lo cual explica también el hecho de que los pacientes tuvieran una recuperación rápida en la densidad espermática pero con un porcentaje de células normales por debajo del estándar y que su IFA fuera de 80% es decir significativamente muy por arriba del estándar.

Los radicales libres pueden generar modificaciones de bases y hacerlas sensibles al álcali por las ERO's por la presencia de espermatozoides inmaduros (Saleh *et al.*, 2002; Henkel *et al.*, 2005), lo que podría explicar la baja calidad seminal de muestras de jóvenes clínicamente sanos, con ADN fragmentado, siendo estas detectadas con la elevada sensibilidad de la versión alcalina del ensayo cometa, hecho por el cual se utilizó en este estudio ya que los radicales libres pueden ser generados también por agentes químicos a los que nos exponemos como el caso de las muestras de individuos sobrevivientes a linfoma de Hodgkin.

El tabaquismo y el abuso del alcohol son nocivos para la calidad del semen (Sofikitis *et al.*, 1995). Esto nos podría indicar por qué en jóvenes clínicamente sanos se está presentando una calidad baja al momento de la espermatobioscopia aunque en los cuestionarios realizados la mayoría dijo no fumar ni beber. Esto nos sugiere que las muestras de donantes clínicamente sanos analizadas con calidad seminal baja y ADN espermático fragmentado se debe por el consumo de alcohol y tabaco con frecuencia, ya que estos individuos

son jóvenes menores de 25 años y tendrían que presentar una calidad seminal normal y un ADN normal, o bien pueden presentar fragmentación de ADN y no saber que pueden ser infértiles hasta el momento de pretender tener hijos.

Los grupos tratados en este estudio presentan un IFA por encima del 30% que es el límite umbral para decir que existe daño en el ADN de los espermatozoides (Larson *et al.*, 2000), demostrándose que mientras más alto sea el IFA los valores seminales son más bajos en comparación con aquellos donde la calidad seminal es normal, hombres con un IFA $\geq 30\%$ se encuentran en alto riesgo de fallas en el desarrollo del blastocito (Michael *et al.*, 2004).

9. CONCLUSIONES

1. En el hombre la baja calidad seminal está relacionada con la fragmentación del ADN en el espermatozoide.
2. La infertilidad y el daño en el ADN espermático tienen una fuerte relación.
3. El ensayo cometa es un análisis útil para la detección de problemas en la reproducción, y para determinar si un hombre que se sometió a quimioterapia puede heredar las aberraciones genéticas generadas por la misma.
4. Se puede generar un diagnóstico temprano de infertilidad masculina mediante el ensayo cometa.
5. Se debe implementar el ensayo cometa como una técnica rutinaria en el análisis de calidad seminal y espermática para dar un mejor diagnóstico.
6. Los agentes quimioterapéuticos causan daño directo al ADN espermático.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayo cometa a pH neutro para detectar rupturas de cadena doble a las muestras analizadas en el presente estudio.
- Realizar los dos tipos de ensayo cometa (pH alcalino y pH neutro) juntos para detectar rompimientos de cadena simple y doble en la misma célula si es que existen.
- Realizar análisis de microdelesiones para las muestras que no resultaron con daño en el ADN y que tienen una calidad seminal normal.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. (2012). **Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health.** J Androl. 33(6):1096-1106.

Agarwal A, Allamaneni SR. (2004). **The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes.** A review. Minerva Ginecol. 56 (3):235-245.

Agarwall A, Allamaneni SR. (2005). **Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina.** Rev. Int. Androl.; 3(1).

Altamirano M, Valverde M, Álvarez L, Molina B, Rojas E. (1999). **Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice II. Effects in several mouse tissues.** Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 16:243-255.

ACS. (2014). **La fertilidad de los hombres con cáncer.** Asociación Americana contra el Cáncer pp.26.

Arencibia D, Rosario F, Suárez Y. y Soroa Y. (2003). **Protocolo de ensayo cometa a partir de espermatozoides de epidídimos de roedores.** (Retel) Revista de toxicología en línea Cuba. Trabajo de revisión pp. 38-50.

Avendaño C, Oehninger S. (2011). **DNA fragmentation morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era?** Journal of Andrology. 32(4):356-363.

Balhorn R. (1982). **A model for the structure of chromatin in mammalian sperm.** J. Cell. Biol.; 93 (2): 298-305.

Balhorn R, Weston Suen, Thomas C y Wirobek A. (1984). **DNA Packaging in Mouse Spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins.** Experimental cell research. 150; 298-308.

Bellvé AR, Anderson E y Hanley L. (1975). **Synthesis and amino acid composition of basic proteins in mammalian sperm nuclei.** Dev. Biol.; 47(2): 349-365.

Bench G, Corzett MH, Kramer CE, Grant PG y Ballhorn R. (2000). **Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with protamine 2.** Mol. Reprod. Dev.; 56(4): 512-519.

Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, et al. Sperm (2003). **DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss.** Arch Androl. 49(1):49-55

Casulo C, Rich L. (2014). **Linfoma de hodgkin.** Leukemia and lymphoma society fighting blood cancer.

Cermeño García J. (2007). **Estudio del efecto genotóxico inducido *in vivo* por la Casiopeína II-gly y por la Casiopeína III-ia.** Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza pp. 52. Tesis de licenciatura.

Collins A, Cadet J, Epe B, Gedik C. (1997). **Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, January 19–21, 1997.** *Carcinogenesis* 18:1833–1836.

Collins AR. (2004). **The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations.** Department of Nutrition, University of Oslo. *Review Molecular Biotechnology.* 26: 249–261.

Cortes Barberena E. (1997). **Detección del daño de ADN por medio de electroforesis unicelular en células de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia.** UAM Unidad Iztapalapa división de ciencias biológicas y de la salud México D.F. pp. 72. Tesis de maestría.

Cortéz EI, Dávila MI, López C, Fernández JL, Gosálvez J. (2007). **Evaluación del daño en el DNA espermático.** *Actas Urológicas Españolas.* 31(2):120-131.

Cruz I, Colmenares M, Berrueta L, Gómez R, Henry Montes H, Berrueta L, Salmen S, Osuna JA. (2010). **Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen.** *Investigación Clínica* 51(1):87-99.

Curry MR y Watson PF. (1995). **Sperm structure and function.** Grudzinskas JG y Yovich JL eds. Cambridge: University Press,; (3); 45-69.

Eddy E.M. (1994). The spermatozoon in: **The physiology of reproduction.** Second edition. Edited by Knobil E. and Neill JD. Raven press, Ltd., New York.

Enciso M, Muriel L, Fernández JL. (2006). **Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test.** *Journal of Andrology* 27: 106–111.

Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL y Gosálvez J. (2009). **A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa.** *Reproductive BioMedicine Online* La Coruña, España. 18: 609-616.

Enciso M, Iglesias M, Galan I, Sarasa J, Gosálvez A, Gosálvez J. (2011). **The ability of sperm selection techniques to remove single- or double-strand DNA damage.** *Asian Journal of Andrology.* 46:1-5.

Esterhuizen A, Franken D, Lourens J, Prinsloo E, Van Roogen L. (2000). **Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates.** *Hum. Reprod.* 15: 637-661.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Mehamed MR, (1980). **Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.** *Science.* 210:1131-1133.

Evenson D, Jost L, Marshall D, Zinaman M, Clegg E, Purvis K. (1999). **Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic.** *Hum. Reprod.* 14: 1039-1049.

Flaherty C, Hales B, Chan P, Robaire B. (2011). **Efecto de la quimioterapia y el cáncer testicular avanzado o el linfoma de Hodgkin en la integridad del acido**

desoxirribonucleico del espermatozoide. Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción. 3(3):123-132.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. (2000). **Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa.** Hum Reprod. 15(4):830-839.

Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálves J y Fernández JL. (2008). **Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma.** Fertility and Sterility. Aug; 90(2): 328-34.

Garner DL. (1997). **Ancillary tests of bull semen quality. Bull Infertility. Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice.** 13: 313-330.

Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J. (1992). **Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg.** Hum Genet. 89(2):181-186.

Gil GE, Ollero M, López M, Sharma R, Álvarez J, Thomas AJ, et al. (2001). **Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation.** Hum Reprod. 16:922-930

Goldberg RB, Geremia R, Bruce WR. (1977). **Histone Synthesis and Replacement during Spermatogenesis in the Mouse.** Differentiation 7:167-180

González MA, Rawe V. (2010). **Fragmentación del ADN espermático: su dinámica en el tiempo y la importancia de ir más allá de lo evidente** Reproducción 25:185-191

Gorrita Y, Gorrita R. (2013). **Microdeleciones del cromosoma Y como causa de la infertilidad masculina.** Revista de Ciencias Médicas La Habana. 19(1):

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

Henkel R, Kierspel E, Staff T, Mehnert R, Timeberg H, Schill W, Kruger T. (2005). **Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients.** Fertil Steril. 83:635-42.

Hernández A. (2004). **Estudio cinético de la descondensación nuclear del espermatozoide a través del citómetro de flujo.** Universidad Autónoma Metropolitana División de ciencias biológicas y de la salud pp. 21.

Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. (2003). **Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment.** Reprod Biol Endocrinol 1: 107.

Hu Y, Maxson W, Hoffman D, Ory S, Eager S, Dupre J, Lu C. (1998). **Maximizing pregnancy rates and limiting higher-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality.** Fertility and Sterility. 69(4):650-657.

- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aidken RJ. (2000). **DNA integrity in human spermatozoa relationships with semen quality.** J Androl. 21:33-44.
- Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. (2011). **Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa.** Biochem J. 436(3):687-698.
- Kvist U. (1980). **Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man.** Acta Physiology Scand.; 109: 79-84.
- Larrea MM. (2007) **Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay.** Universidad Mayor de San Andrés La Paz Bolivia. pp.150. Tesis de licenciatura en bioquímica.
- Larson KL, De Jonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. (2000). **Relationship of assisted reproductive technique (ART) outcomes with sperm chromatin integrity and maturity as measured by the sperm chromatin structure assay (SCSA).** Hum Reprod. 15:1717-1722.
- López S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J y Casper RF (1998). **Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection.** Fertil Steril. 69: 528-532.
- Málaga YR, Ortiz DA, Hernández I, Tovar JM, Ruíz AA. (2005). **Detención de la espermatogénesis.** Ginecología y Obstetricia de Mexico. 73:500-508.
- Mahfouz R, Sharma R, Thiyagarajan A, Kale V, Gupta S, Sabanegh E, Agarwal A. (2010). **Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species.** Fertility and Sterility. 94(6):2141-2146.
- Martín RC, Campana A. (1993). **Physiopathology of spermatogenic arrest.** Fertil Steril. 60(6):937-945.
- Matsumoto A, Hadashi E, Rock J y Rosenwaks Z. (1996). **Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology.** Philadelphia-New Cork. Lippincott-Raven, pp 359-384.
- Meinteires S, Nesslany F, Pallardy M, Marzin D. (2003). **Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure the apoptosis.** Envir. Mol. Mut. 41: 260-269.
- Michaeli M, Perr S, Anderman S, Ballas S, Ellenbogen A. (2004). **Post swim up versus original semen quality, and strict criteria morphology, it's influence on fertilization rate in vitro program. a pilot study.** International Congress Series. 1271:181-184.
- Morales R, Lledó B, Ortiz José A, Rodríguez Arnedo Dori, Fabregat A y Bernabéu R. (2007). **Sperm DNA fragmentation and implications for fertility** Revista Iberoamericana de Fertilidad. 24: 305-313.
- Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. (2009). **Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities.** Urology. 74(4):789-793.

O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. (2006). **Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events.** Free radical biology & medicine. 41(4):528-540.

Ostling O y Johanson KJ. (1984). **Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cell.** Biochem Biophys Res Commun. 123: 291-298.

Peiro Agustin. (2012). **Caracterización múltiple de la fragmentación del ADN espermático en pacientes infértiles.** Universidad Autónoma de Barcelona. Memoria para obtener el grado de doctor. pp. 195.

Perreault SD, Naish SJ y Zirkin BR. (1987). **The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content.** Biol. Reprod.; 36: 239-244.

Perreault SD. (1990). **Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization.** En Bavister BD, Cumming SJ, Roldan ERS (eds). Fertilization in Mammals. Norwell: Serono Symposia.; 285-296.

Poirot C, Cherruau B. (2005). **Infertilidad masculina Aspectos clínicos e investigaciones biológicas.** Acta bioquímica clínica latinoamericana. 39: 225-241.

Portella J, López R, Noriega-Hoces L, Guzmán L. (2013). **Modelo predictivo de fragmentación de ADN espermático usando parámetros evaluados en un espermatograma.** Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia: Trabajo ganador del concurso Premio Merck Serono, XVI Congreso Peruano de Medicina Reproductiva y I Congreso Latinoamericano de ISMAAR, Lima. pp. 21-27.

Poletta GL. (2011). **Monitoreo de daño inducido por plaguicidas en Caimán latirostris (*Yacaré overo*) como organismo centinela de los humedales de Argentina.** Biblioteca digital FCEN-UBA Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Buenos Aires Argentina. pp. 229. Tesis doctoral.

Pradeepa MM y Rao MR. (2007). **Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins.** Soc. Reprod. Fertil. Suppl.; 63: 1-10.

Prakash P, Leykin L, Chen Z, Toth T, Sayegh R, Schiff I. (1998). **Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria).** Fertil steril 69:722-726

Retana UR, Roldán RE, Legorreta HM (2007). **Protocolo para la detección de daño al ADN por electroforesis unicelular alcalina (Ensayo Cometa).** En: MANUAL DE PRÁCTICAS PARA EL LABORATORIO DE GENÉTICA CLINICA PARTE I. FES-Z, UNAM. México, DF. pp. 109.

Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S, Presani G. (2009). **Semen preparations methods and Sperm apoptosis: swim up versus gradient density centrifugation technique.** Fertil Steril. 91:632-638.

Rodríguez JJ. (2006). **Estudio de los efectos inducidos *in vitro* por tres óxidos de vanadio a nivel celular y sobre el ADN.** Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. pp. 99, Tesis Doctoral.

Rodríguez JJ, Roldan E, Altamirano M. (2003). **Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells.** *Toxicol. Lett.* 144:359-369.

Romanato M. (2009). **Papel del heparan sulfato en el proceso de descondensación de la cromatina del espermatozoide humano.** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. pp. 131, Tesis Doctoral

Ruíz MF. (1988). **Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción,** UNAM México ediciones Omega. pp. 370.

Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Álvarez JG, Thomas AJ y Sharma RK. (2002). **Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study.** *Fertil Steril*; 78: 313-8.

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

Sakkas D, Álvarez JG. (2011). **Fragmentación del ADN espermático: mecanismos de origen, repercusión en los resultados reproductivos y análisis.** *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción.* 3: 160-175.

Sarabia L, Munuce MJ. (2011). **Nuevos valores para el espermograma OMS 2010.** Cartas al editor, *Rev Med Chile.* 139:548-549.

Shen H, Ong C. (2000). **Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility.** *Free Radic Biol Med.* 28:529-536.

Simon L, Lutton D, McManus J, Lewwis S. (2011). **Sperm DNA damage measured by the alkaline comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success.** *Fertility and Sterility.* 95(2):652-657.

Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, Lewwis S. (2013). **Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF.** *Reproductive Biomedicine Online.* 26:68-78.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR y Schneider EL, (1988). **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** *Exp. Cell. Res.* 175: 184-191.

Sofikitis N, Migayana I, Dimitriadis D. (1995). **Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity.** *J Urol.* 154: 1030.

Speit G, Hartmann A. (2006). **The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair.** *Methods Mol. Biol.* 314: 275-286.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC y Sasaki YF. (2000). **The single cell gel /comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.** *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 35: 206–221.

Villani P, Eleuteri P, Giuseppa M, Rescia M, Altavista P, Spano M, Pacchierotti F, Cordelli E. (2010). **Sperm DNA fragmentation induced by DNase I and hydrogen peroxide: an in**

vitro comparative study among different mammalian species. *Reproduction*. 140:445-452.

Ward WS y Coffey D. (1991). **DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells.** *Biol. Reprod.* 44: 569-574.

World Health Organization. (1999). **WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction.** Cambridge: Cambridge University Fourth Edition.

World Health Organization. (2010). **“WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen”** Cambridge: Cambridge University. Fifth Edition.

Yanagimachi R. (1994). **Mammalian fertilization. The Physiology of Reproduction** Eds. Knobil E y Neill JD, Raven Press Ltd, New York pp. 189-317..

Zuñiga LA. (2009). **Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana** Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Biociencias. pp. 223. Tesis doctoral.

ANEXOS

Tabla anexo 1. Quimioterapéuticos de riesgo que provoquen infertilidad

Agentes de alto riesgo	Agentes de bajo riesgo
Actinimicina D	5-fluorouracilo (5-FU)
Bulsufin	6-mecaptopurina (6MP)
Carboplatino	Bleomicina
Carmustina	Citarabina
Cloranbucil	Dacarbazina
Cisplatino	Daunorubicina (adriamicyn)
Ciclofosfamida	Doxorrubicina
Citarabina	Epirubicina
Ifosfamida	Etoposido VP-16
Lomustina	Fludarabina
Melfalan	Metrotexato
Mostaza nitrogenada (mecloretamina)	Mitoxantrona
procarbazina	Tioguanina 6-TG
	Tiotepa
	Vinblastina
	Vincristina

(ACS, 2014).



UAEM

Universidad Autónoma
del Estado de México

Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados
Centro de Investigación en Ciencias Médicas

Otorga la presente

Constancia

AARÓN GALINDO VEGA, JORGE A. CASILLAS PILGRAM, CRISTINA
ALVARADO DOMÍNGUEZ, ELIA ROLDÁN REYES

Por su participación en la presentación en cartel del trabajo:

EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA ESPERMÁTICO EN
HOMBRES INFERTILES MEDIANTE ENSAYO COMETA

7º Congreso Internacional de Investigación
en Salud "Evidencia de Impacto Social"
que se llevó a cabo los días 28, 29 y 30 de abril de 2015

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2015, Año del Bicentenario Luctuoso de José María Morelos y Pavón"
Toluca, México, abril de 2015

Centro de Investigación
en Ciencias Médicas
U A E M

M. en ED. J. Amado López Arriaga
Coordinador

