



Universidad Nacional Autónoma de México
Hospital Ángeles del Pedregal



**CORRELACION ENTRE EL GRADO DE FRAGMENTACION DEL
ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) ESPERMATICO Y LOS
PARAMETROS SEMINALES EN PAREJAS INFERTILES.**

**Tesis para obtener el Título de Especialista en Biología de la
Reproducción Humana**

Presenta:

Dr. Pedro Antonio Ponce Barberena

Asesor de Tesis:

Dr. Héctor Salvador Godoy Morales

México, D. F. a Agosto de 2012





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.



Universidad Nacional Autónoma de México
Hospital Ángeles del Pedregal



**CORRELACION ENTRE EL GRADO DE FRAGMENTACION DEL
ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) ESPERMATICO Y LOS
PARAMETROS SEMINALES EN PAREJAS INFERTILES.**

**Tesis para obtener el Título de Especialista en Biología de la
Reproducción Humana**

Presenta:

Dr. Pedro Antonio Ponce Barberena

Asesor de Tesis:

Dr. Héctor Salvador Godoy Morales

México, D. F. a Agosto de 2012



FIRMAS

Dr. Federico Rodríguez Weber
Jefe de la División de Enseñanza

Dr. Héctor Salvador Godoy Morales
Titular del curso de Biología de la Reproducción Humana

Dr. Héctor Salvador Godoy Morales
Asesor de tesis

Dr. Pedro Antonio Ponce Barberena
Autor de tesis

DEDICATORIA

A Dios: Por darme la vida, por guiar mi camino, por hacer de cada tropiezo un acierto, por estar conmigo siempre, por ser mi amigo.

A mis padres: Por enseñarme con su ejemplo a ser mejor persona, por demostrarme la importancia del amor, por regalarme el valor de la humildad, el trabajo, el profesionalismo, la ayuda al prójimo. Así como la convicción que no existe mayor fuerza humana que la fuerza de la familia unida. Por dejarme vivir mis derrotas, que con un beso y un abrazo las viven conmigo. Por nunca haber sentido carencias, ni materiales, ni espirituales. Por esas charlas tan enriquecedoras con la licenciada Amparo y el Dr. Pete en donde a veces se meten mis papás. Gracias eternas, los amo.

A mi hermana: Por estar siempre conmigo, por enseñarme a no caer ante la adversidad, por tener un corazón enorme donde tengo un espacio, que ella me regalo desde que nació. Gracias manita, a tí y a tu hermosa familia Tony y Naty.

A mi esposa: Por existir, por estar en el momento preciso, en el lugar preciso, por aquella primera mirada, más azul y hermosa que el cielo, de la cual aún no me repongo, por iluminar mi día en cada mañana, por ser esa estudiante intranquila con preguntas irrespondibles, por llevar esa curiosidad hasta el límite de la ciencia, donde a veces he tenido que recurrir para complacerla y de donde viene gran parte de mi sabiduría. Gracias por ser el motor que me impulsa, por ser esa mujer que camina a mi lado, mi compañía. Y sobre todo por tenerme paciencia al igual que nuestro hijo en los momentos de ausencia familiar que exige la profesión. Gracias Katia, mi pu, te amo.

A mi hijo: Que nos vino a acompañar en este camino. Que llegó igual que su mamá, exactos en tiempo y espacio. A él por el cual me levanto todos los días en la lucha por ser mejor persona. Ahora Pedrito ya habla tiene más de 3 años y me recuerda todos los días la importancia de la familia. Te amo Pedrito.

A mi Tía Yoli: Quien siempre ha estado al pendiente de mí y de mi familia. Quien ha estado a mi lado desde el principio y con quien estaré eternamente agradecido. Gracias Tía, a tí y a mis primos.

A la familia Lizárraga Torres: Por ser ejemplares en su apoyo incondicional, por estar siempre en todo momento. Por escuchar con atención y sorprenderse con las anécdotas de mi diario vivir en el hospital. Por ser testigos de mi crecimiento personal y profesional. Gracias a mis suegros, Sr. Marco, Sra. Caro y a mi nuevo hermano el Dorf.

A mis maestros: Por su dedicación y tiempo, por creer en mí y enseñarme lo mejor que tiene esta profesión, no solo en lo académico sino en el vivir día a día con la satisfacción de ayudar al que lo necesita. Gracias masters.

A mis amigos: A todas las personas a las que tuve la oportunidad de conocer en este camino, que en algún momento se convirtieron en hermanos. Y aquellos de los que me tuve que alejar por perseguir mis sueños y que nunca se fueron. Gracias brothers.

A aquellas personas, que me enseñaron a pensar, a recetar, a operar, a ser médico y sobre todo a ser mejor persona, con la lección del milagro de la vida. Son anónimas, más bien son muchas las pacientes para nombrarlas una por una. A todas ellas, gracias.

CORRELACION ENTRE EL GRADO DE FRAGMENTACION DEL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) ESPERMATICO Y LOS PARAMETROS SEMINALES EN PAREJAS INFERTILES.

RESUMEN

ANTECEDENTES: Los parámetros seminales convencionales asociados con la fertilidad masculina son la concentración, motilidad y morfología. Más del 30% de daño en el DNA espermático se relaciona a una baja tasa de fecundación independientemente de la alteración en estos parámetros. Su asociación es controversial.

OBJETIVO: La correlación entre el porcentaje de fragmentación del DNA y parámetros seminales, pretendiendo establecer una posible causa-efecto y así un tratamiento para mejorar la capacidad de fecundación.

MATERIAL Y METODOS: Análisis retrospectivo de pacientes que acudieron para evaluación de la pareja infértil de diciembre 2009 – agosto 2011. Se utilizan los criterios de normalidad de la Organización Mundial de la Salud(OMS) del 2010 en los parámetros seminales. Para el daño del DNA por fragmentación un punto de corte de $\geq 30\%$, con técnica de dispersión de la cromatina. Los resultados se expresaron en promedio \pm desviación estándar y se aplicaron las pruebas de Spearman, Mann-Whitney y Fisher estableciendo un valor de $p < 0.05$ para significancia estadística.

RESULTADOS: Se incluyeron 97 pacientes de 38.7 ± 5.9 años de edad, el 38% presentó daño significativo al DNA. Existe correlación entre el porcentaje de fragmentación del DNA y la motilidad espermática ($p < 0.001$) y con leucocitospermia ($p 0.03$).

CONCLUSION: Si el origen del daño a la cromatina del espermatozoide es susceptible a tratamiento, este podría mejorar la motilidad espermática. Aquellos pacientes con leucocitospermia podrían disminuir el porcentaje de fragmentación del DNA con el uso de antibióticos y antiinflamatorio al tratar la infección. Intervenciones a favor de la capacidad de fecundación.

PALABRAS CLAVES: Fragmentación, DNA, espermátobioscopía directa, oligo-asteno-terato-zoospermia.

Tabla de contenido

| | |
|--|-----------|
| ANTECEDENTES | 7 |
| MARCO TEORICO | 7 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACION | 8 |
| JUSTIFICACION | 8 |
| HIPOTESIS..... | 8 |
| OBJETIVO | 8 |
| MATERIAL Y METODOS | 8 |
| DEFINICION DE VARIABLES | 10 |
| ETICA | 13 |
| RESULTADOS..... | 13 |
| ANALISIS..... | 17 |
| CONCLUSION | 18 |
| ANEXO : TABLAS Y GRAFICOS | 19 |
| BIBLIOGRAFIA | 22 |

ANTECEDENTES

El estudio de la calidad del semen es utilizado frecuentemente para evaluar la fertilidad en el factor masculino. Los criterios establecidos por la OMS (Organización Mundial de la Salud) utilizando los parámetros convencionales permite la separación de las muestras de semen en normal y anormal (7). Aun así la capacidad del espermatozoide para fertilizar podría estar dada por defectos en la membrana, factores ambientales, genéticos y por lo tanto no detectables en la espermatobioscopia directa (ED). Mientras tanto, existe un interés creciente en la evaluación del daño del DNA espermático en la muestra seminal del hombre infértil. Se han realizado varios estudios que evidencian la relación entre la integridad del DNA espermático y la fertilidad. Estos trabajos demuestran que los varones infértiles tienen una mayor fracción de espermatozoides con roturas de la cromatina(2)(3).

Dos estudios independientes en Europa y Estados Unidos demostraron que un índice de fragmentación del DNA superior al 30%, con la técnica de SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), es incompatible con la fertilidad in vivo, independientemente de la concentración, motilidad y morfología espermática (4). Chohan y colaboradores demostró el mismo punto de corte con tres técnicas diferentes para la fragmentación del DNA espermático (TUNEL:Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, SCD:Sperm Chromatin Dispersion, SCSA)(3).

La relación entre el daño del DNA y parámetros seminales reportados en la espermatobioscopia directa sigue siendo polémica (1). De los parámetros seminales convencionales asociados con la fertilidad masculina están la concentración, motilidad y morfología, en relación a la oligo-asteno-terato-zoospermia. Aunque algunos estudios han reportado una relación débil entre los parámetros convencionales de la muestra seminal y la fragmentación del DNA, otros indican que en pacientes con muestras anormales en la ED tienen niveles elevados de fragmentación de la cromatina espermática (5). El intentar establecer una asociación podría en un momento dado dar la pauta para el tratamiento de la capacidad fecundante, sobre todo si esta asociación se interpreta en términos de causa – efecto.

MARCO TEORICO

FRAGMENTACION DEL DNA ESPERMATICO

Durante el proceso de espermatogénesis, en cualquiera de sus etapas, se puede producir un daño al DNA. Es un fenómeno multifactorial y no del todo delimitado. Se conocen algunos factores que pueden producir daño irreversible en el DNA de espermatozoide. Se describe: generación de radicales libres de oxígeno o estrés oxidativo, empaquetamiento anormal de la cromatina, deficiencia en la recombinación y apoptosis tras la salida del espermatozoide a los túbulos. De los factores externos se conocen: condiciones ambientales, contaminación, tabaquismo, temperatura testicular elevada, procesos patológicos como criptorquidia, varicocele, procesos inflamatorios o infección del tracto genital, cáncer, episodios febriles y estrés(9). Sin embargo la repercusión del daño del DNA espermático en la capacidad del espermatozoide para fecundar depende también de la calidad ovocitaria(10).

En el estudio actual se pretende relacionar los parámetros seminales y la fragmentación del DNA espermático, de forma independiente al posible origen del daño a la cromatina.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Existe alguna variabilidad en los parámetros seminales de acuerdo al grado de fragmentación del DNA espermático?

JUSTIFICACION

Los parámetros seminales convencionales asociados con la fertilidad masculina son la concentración, motilidad y morfología. Mas del 30 % de daño en el DNA espermático se relaciona a una baja tasa de fecundación independientemente de la alteración en estos parámetros. Su asociación es controversial y pueden existir pacientes con sin alteración en los parámetros seminales con fragmentación significativa al DNA espermático y ser clasificados como sanos.

HIPOTESIS

El grado de fragmentación del DNA espermático puede afectar los parámetros seminales en pacientes que acuden a la valoración de la pareja infértil.

OBJETIVO

Analizar de forma retrospectiva, la relación entre el porcentaje de fragmentación del DNA espermático y los parámetros seminales convencionales y los relacionados a la oligo-asteno-terato-zoospermia (OAT), según los nuevos criterios de la OMS (2010), en pacientes que acudieron para evaluación de la pareja infértil. De esta manera darle más peso a los parámetros seminales en la evaluación de la capacidad fertilizante en el factor masculino, pretendiendo establecer una posible causa-efecto y así un tratamiento para mejorar la capacidad de fecundación.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizó una base de datos realizada desde Diciembre 2009 – Agosto 2011, en donde recaba información del paciente masculino que acude para evaluación de la pareja infértil, la cual es obtenida del expediente clínico, examen seminal y estudio de fragmentación del DNA espermático.

Se incluyó en el estudio resultado de muestras individuales por paciente con resultado de la espermatobioscopia directa y fragmentación del DNA, en caso de que el paciente se realizara un nuevo estudio seminal este se tomaba en cuenta solo si contaba con un nuevo estudio de fragmentación.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de andrología de la unidad de medicina reproductiva del hospital para la espermatobioscopia y de forma externa para el DNA fragmentado con técnica SCD.

Los parámetros convencionales a evaluar fueron: edad, volumen, vitalidad, pH y la presencia de leucocitos en la muestra, así como la concentración, la motilidad y la morfología. Los tres últimos relacionados a la oligo-asteno-terato-zoospermia. Con rangos de normalidad según los criterios de la OMS del 2010.

Para la fragmentación del DNA se tomó como punto de corte de 30 % o más, para daño significativo y afectación de la fertilidad según publicaciones anteriores. Se dividieron en dos grupos para la comparación con los parámetros seminales : grupo I para fragmentación alta y grupo II sin fragmentación.

PARAMETROS SEMINALES CONVENCIONALES

En el 2010 la OMS presenta, en su manual para la examinación y el procesamiento del semen humano en su 5ta edición, los nuevos criterios de normalidad para la muestra seminal. Presentando cambios con respecto a los publicados 1999 siendo de los más importantes la reducción en el rango mínimo de normalidad para la morfología de los espermatozoides de 15% al 4% respectivamente(7).

Tabla 1. Criterios de normalidad según la OMS para muestra seminal (2010).

| Parámetro | Valor normal | Percentil e intervalo de confianza |
|------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| Volumen (ml.) | ≥1.5 | P5 th (IC 95%: 1.4 – 1.7) |
| Concentración (millones/ml.) | ≥15 | P5 th (IC 95%: 12 – 16) |
| Motilidad progresiva (%) | ≥32 | P5 th (IC 95%: 31 - 34) |
| Motilidad total (%) | ≥40 | P5 th (IC 95%: 38 - 42) |
| Vitalidad (%) | ≥58 | P5 th (IC 95%: 55 -63) |
| Morfología (%) | ≥4 | P5 th (IC 95%: 3 - 4) |
| pH | 7.2 | Por consenso |
| Leucocitos (millones/ml.) | ≤1.0 | Por consenso |

- WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. 2010.

Tabla 2. Comparación de los criterios de normalidad según la OMS 1999 y 2010

| Parámetro | OMS 1999 | OMS 2010 |
|------------------------------|-----------|----------|
| Volumen (ml.) | 2 – 6 | ≥1.5 |
| Concentración (millones/ml.) | ≥20 | ≥15 |
| Motilidad progresiva (%) | ≥50 | ≥32 |
| Motilidad total (%) | ≥25 | ≥40 |
| Vitalidad (%) | ≥50 | ≥58 |
| Morfología (%) | ≥15 | ≥4 |
| pH | 7.2 – 8.2 | ≥7.2 |
| Leucocitos (millones/ml.) | ≤1.0 | ≤1.0 |

- WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. 2010.

DEFINICION DE VARIABLES

| Variable | |
|-----------------------------|---|
| Edad | <p>Definición Edad del varón al momento de los estudios</p> <p>Operacionalización Diagnóstico registrado en el expediente</p> <p>Escala Todas las edades</p> |
| Concentración | <p>Definición El número de espermatozoides por mililitro de eyaculado</p> <p>Operacionalización Diagnóstico registrado en el expediente</p> <p>Escala Más de 15 millones por mililitro</p> |
| Motilidad total | <p>Definición Porcentaje de espermatozoides por campo, móviles bajo el microscopio, sin importar tipo de desplazamiento</p> <p>Operacionalización Diagnóstico registrado en el expediente</p> <p>Escala 40 % o más</p> |
| Variable | |
| Movilidad progresiva | <p>Definición Porcentaje de espermatozoides por campo, móviles con desplazamiento progresivo.</p> <p>Operacionalización Diagnóstico registrado en el expediente</p> <p>Escala 32 % o más</p> |

| | |
|-------------------|--|
| Vitalidad | <p>Definición Porcentaje de espermatozoides inmóviles positivos para prueba de tinción vital con eosina.</p> <p>Operacionalización Diagnóstico registrado en el expediente.</p> <p>Escala 58% o más</p> |
| Morfología | <p>Definición Porcentaje de espermatozoides con cabeza, cuello y cola de forma y cantidad normal según estándares de la OMS.</p> <p>Operacionalización Diagnóstico registrado en el expediente</p> <p>Escala 4% o más</p> |
| Variable | |
| Volúmen | <p>Definición Cantidad en mililitros de la muestra eyaculada.</p> <p>Operacionalización Diagnóstico registrado en el expediente</p> <p>Escala 1.5 ml o más</p> |
| PH | <p>Definición Valor numérico correspondiente al logaritmo base 10 de la concentración de hidrógenos.</p> <p>Operacionalización Diagnóstico registrado en el expediente.</p> <p>Escala 8</p> |

| Variable | |
|-------------------|---|
| Leucocitos | <p>Definición Células blancas inflamatorias en la muestra eyaculada por cada mililitro de muestra eyaculada.</p> <p>Operacionalización Diagnóstico registrado en el expediente.</p> <p>Escala Menos de 1 millón de células por mililitro</p> |

TECNICA DE DISPERSION DE LA CROMATINA ESPERMATICA (SCD)

La técnica se basa en la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado. En donde se produce una descondensación de la cromatina en los espermatozoides afectados. Comenzando con la inmersión de las bandejas con las muestras en una solución de ácido desnaturalizante (0.08 N HCL) por siete minutos a 22oC.

Las proteínas son removidas transfiriendolos a una bandeja con una solución neutralizante y de lisis (0.4 M Tris, 0.4 m 1,4-dihitetriol DDT, 1% Triton X -100 y 50 mM de ácido etilen-diamino-tetra-acético EDTHA, pH 7.5) por 15 minutos a 22oC , seguido por un lavado en un amortiguador de Tris-borato-EDTA(0.09 M tri borato y 0.002 M EDTA, pH 7.5) por 2 minutos; deshidratado en forma secuencial con baños de etanol al 70%, 90% y 100% (2 minutos cada uno) y luego secado en aire ambiente. Se evalua el tamaño del halo y el patrón de dispersión en aproximadamente 500 espermatozoides en cada portaobjetos. Los espermatozoides con DNA fragmentado no muestran halos y los intactos desarrollan halos grandes alrededor del nucleoide.

Fernández y colaboradores en el 2003 describe cuatro patrones: núcleo con un halo grande de dispersión, núcleo con un halo mediano de dispersión, núcleo con un halo pequeño de dispersión y el núcleo sin halo de dispersión. Los dos últimos considerados con fragmentación del DNA (8). El punto de corte para daño significativo es del 30% de espermatozoides evaluados, según publicaciones anteriores con esta técnica.

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos son analizados utilizando el programa de computadora SPSS 16.0. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (SD).

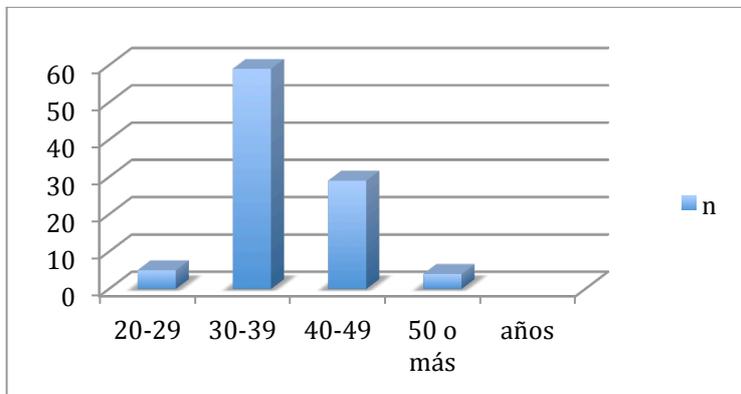
Para la correlación de los de fragmentación y los parámetros seminales convencionales, se utilizó el test de Fisher. Se aplicó la prueba de correlación de Spearman para la edad, porcentaje de fragmentación, concentración, motilidad y morfología y de Mann- Withney para la correlación entre grupos de fragmentación. Los valores de $p < 0.05$ para significancia estadística.

ETICA

De acuerdo con los artículos 96, 100 y 102 de la Ley General de Salud a los que se rige las Instituciones médicas privadas, este estudio se puede catalogar como de riesgo mínimo ya que la información fue recolectada de pacientes ya tratados y bajo la atención indicada por el servicio. Los datos obtenidos serán de expedientes clínicos y los formatos de recolección y el manejo de los nombres será de manera agrupada. A este estudio no aplican otro tipo de consideraciones.

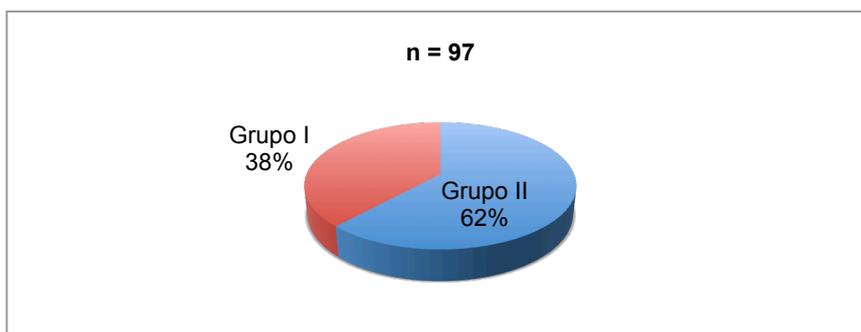
RESULTADOS

Gráfico 1. Distribución de pacientes por grupo de edad



El estudio incluyó 97 pacientes con un promedio de edad de 38.7 ± 5.9 años. Siendo el grupo con mayor cantidad de pacientes el de los 30 – 39 años ocupando un 61% (59/97) de la población. Únicamente el 3% (3/97) de los individuos presentaron OAT. Del total de pacientes estudiados un 38% tuvieron una fragmentación alta. El grupo de edad con mayor porcentaje de individuos con fragmentación alta fue los pacientes con 50 años o más con el 75%(3/4) y el menor de los 30 – 39 años con un 34%(20/59).

Gráfico 2. Distribución de pacientes por grupo de fragmentación DNA.



Grupo I : Porcentaje de fragmentación del DNA $\geq 30\%$

Grupo II: Porcentaje de fragmentación del DNA < 30%

La distribución de cada una de las variables de los parámetros seminales convencionales se encontraron en promedio con valores normales, a excepción del número de leucocitos por mililitro (1.4 ± 2.7) elevados. El 54% de los pacientes presentaron leucocitospermia. Con respecto a la morfología de los espermatozoides ($\geq 4\%$) la diferencia entre normales y anormales fue dada por defectos de cabeza ($27.20 \pm 9.89\%$ y $42.28 \pm 14.18\%$). No hubo diferencia en el tipo de defecto entre los grupos de fragmentación del DNA.

Tabla3. Distribución de variables por grupo de fragmentación

| Variable | Grupo I | Grupo II | *p |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------|
| Edad (años) | 38.7±70.21 | 38.7±5.29 | 0.782 |
| Volumen (ml) | 2.08±1.52 | 2.34±1.27 | 0.736 |
| pH | 7.89±0.28 | 7.97±0.28 | 0.167 |
| Concentración (millones/ml) | 106.3±90.07 | 99.38±72.05 | 0.920 |
| Vitalidad (%) | 63.94±14.90 | 65.63±18.32 | 0.143 |
| Morfología (%) | 15.02±9.94 | 19.05±13.72 | 0.176 |
| Motilidad (%) | 41.54±20.06 | 53.56±14.63 | 0.001 |
| Leucocitos (millones/ml) | 1.8±2.60 | 0.45±0.50 | 0.014 |

Grupo I : Porcentaje de fragmentación del DNA $\geq 30\%$

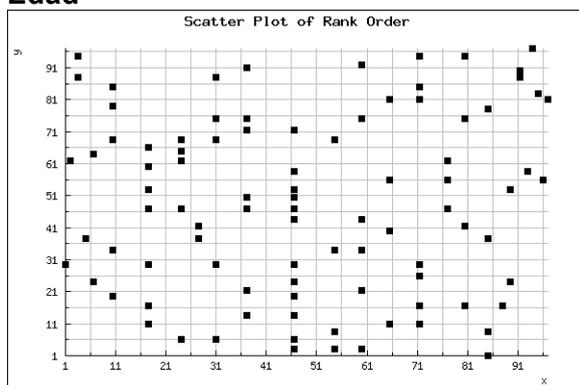
Grupo II: Porcentaje de fragmentación del DNA < 30%

*p < 0.05 - Mann-Withney.

Cada uno de los parámetros seminales convencionales fueron comparables en promedio entre los grupos con fragmentación alta y normal, excepto la motilidad PR ($41.54 \pm 20.06\%$ y $53.56 \pm 14.63\%$) y el número de leucocitos por mililitro (1.8 ± 2.6 y 0.4 ± 0.5) entre el grupo I y II respectivamente. Estos últimos con significancia estadística.

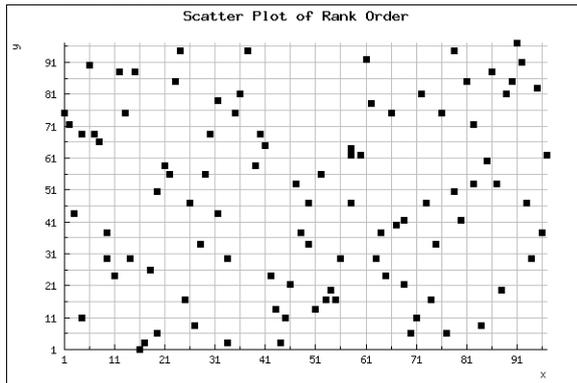
Grafico 3. Prueba de correlación de Spearman para la edad, variables relacionadas a oligo-asteno-terato-zoospermia(OAT) y leucocitos contra fragmentación del DNA.

Edad



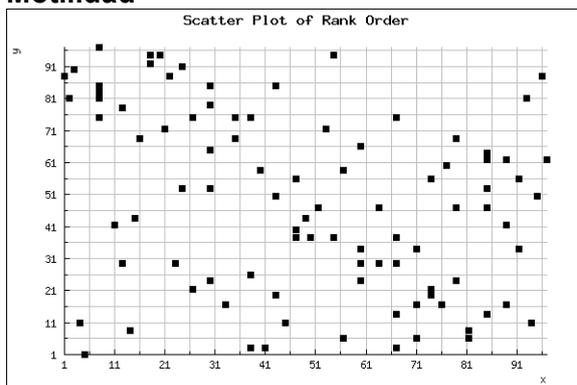
| | |
|--|------------------------|
| Número de variables XY | 97 |
| Spearman r | 0.04288 |
| 95% Intervalo de confianza | -0.1638 a 0.2459 |
| Valor de p | 0.6767 |
| Suma de los valores de p | ns |
| Valor de p exacto o aproximado? | Aproximación Gaussiana |
| Es la correlación significativa? (alfa=0.05) | No |

Concentración



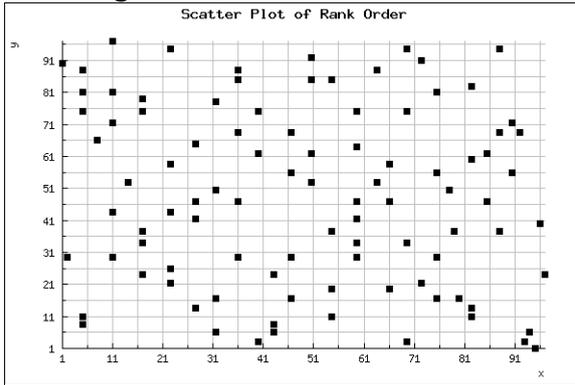
| | |
|--|------------------------|
| Número de variables XY | 97 |
| Spearman r | 0.05688 |
| 95% Intervalo de confianza | -0.1501 a 0.2591 |
| Valor de p | 0.5800 |
| Suma de los valores de p | ns |
| Valor de p exacto o aproximado? | Aproximación Gaussiana |
| Es la correlación significativa? (alfa=0.05) | No |

Motilidad



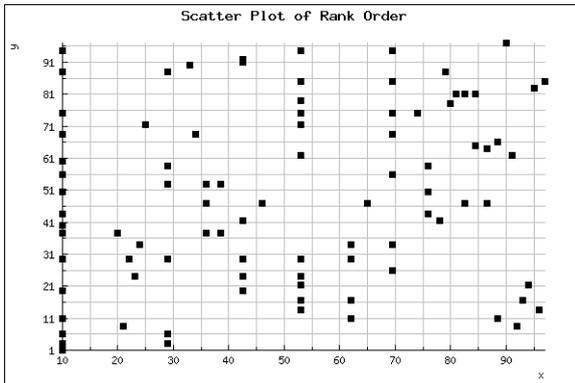
| | |
|--|------------------------|
| Número de variables XY | 97 |
| Spearman r | -0.3271 |
| 95% Intervalo de confianza | -0.4989 a -0.1307 |
| Valor de p | 0.0011 |
| Suma de los valores de p | ns |
| Valor de p exacto o aproximado? | Aproximación Gaussiana |
| Es la correlación significativa? (alfa=0.05) | Sí |

Morfología



| | |
|--|------------------------|
| Número de variables XY | 97 |
| Spearman r | -0.1435 |
| 95% Intervalo de confianza | -0.3387 a 0.06361 |
| Valor de p | 0.1609 |
| Suma de los valores de p | ns |
| Valor de p exacto o aproximado? | Aproximación Gaussiana |
| Es la correlación significativa? (alfa=0.05) | No |

Leucocitos en la muestra seminal



| | |
|--|------------------------|
| Número de variables XY | 97 |
| Spearman r | 0.209 |
| 95% Intervalo de confianza | 0.560 a 2.300 |
| Valor de p | 0.039 |
| Suma de los valores de p | ns |
| Valor de p exacto o aproximado? | Aproximación Gaussiana |
| Es la correlación significativa? (alfa=0.05) | Sí |

El porcentaje de fragmentación del DNA espermático se correlaciona de forma negativa con la motilidad del espermatozoide, siendo que a mayor fragmentación menor motilidad ($r -0.32$, $p 0.001$). El número de leucocitos por mililitro en la muestra seminal es directamente proporcional al porcentaje de daño en la cromatina espermática ($r 0.2$, $p 0.03$).

No se pudo establecer una correlación entre el daño a la cromatina espermática y los parámetros seminales convencionales de volumen, pH, concentración, vitalidad y morfología, según las pruebas aplicadas.

Tabla 9. Fragmentación del DNA espermático vs número de alteraciones en los parámetros seminales (PS).

| | Ninguno | *1 PS | **2 PS | ***3 PS (OAT) | TOTAL |
|--------------------------|---------|-------|--------|---------------|-------|
| Fragmentación \geq 30% | 18 | 14 | 3 | 2 | 37 |
| Fragmentación < 30% | 49 | 8 | 2 | 1 | 60 |
| TOTAL | 67 | 22 | 5 | 3 | 97 |

* p 0.004 – Prueba de Fisher para 1 PS alterado

** p 0.144 – Prueba de Fisher para 2 PS alterado

*** p 0.194 – Prueba de Fisher para 3 PS alterado u oligo-asteno-terato-zoospermia

No se encuentra relación entre los parámetros seminales relacionados a la oligo-asteno-terato-zoospermia con la fragmentación del DNA (p 0.19), probablemente por la poca cantidad de individuos afectados. Sin embargo 2/3(67%) de estos pacientes presentaron daño de la cromatina espermática de manera significativa (\geq 30%). Con una p significativa se correlaciona el porcentaje de fragmentación del ADN y la alteración en un parámetro seminal, sobre todo si esta alteración se trata de la motilidad del espermatozoide, como se comentó anteriormente.

ANALISIS

En el origen del daño a la cromatina espermática se han identificado varios factores causales, los cuales pueden ser identificados durante el interrogatorio y examen físico de la pareja infértil. De igual manera la capacidad fecundante del factor masculino mediante estudios de la muestra seminal.

En un grupo heterogéneo de pacientes como los integrantes de este estudio, no existe relación entre la edad y el porcentaje de fragmentación del DNA. Esto debido a que el origen del daño al DNA puede estar presente en cualquier grupo de edad, por ejemplo, cirugía, tabaquismo, exposición a calor, etc.(9). Sin embargo se pudo identificar en los pacientes de 50 años o más mayor porcentaje de individuos con daño significativo de la cromatina espermática. Al evaluar los parámetros seminales convencionales y relacionados a la oligo-terato-zoospermia, se pudo evidenciar una diferencia significativa entre los grupos de fragmentación en los parámetros de motilidad y leucocitospermia. La relación entre la fragmentación del DNA y la motilidad espermática pudiera no ser del tipo causa – efecto. Sin embargo el origen del daño a la cromatina del espermatozoide pudiera afectar hasta cierto punto el movimiento progresivo en estas células. Estos resultados son comparables con estudios anteriores. Hay que destacar que en los estudios anteriores con variables similares utilizaron rangos de normalidad para los parámetros seminales en general basados en los criterios de la OMS de 1999. Con los parámetros actuales (OMS 2010), pareciera que la morfología de los espermatozoides no se ve asociada a la fragmentación del DNA, como se había reportado en trabajos anteriores donde el tipo de defecto de cabeza, sobre todo la globospermia se relaciona con el porcentaje de daño a la cromatina espermática (6). La presencia de leucocitospermia en las muestras seminales con daño significativo del DNA podría estar relacionada a un factor causal, inflamatorio-infeccioso. Entonces el tratamiento antiinflamatorio- antibiótico en estos pacientes disminuiría el número de leucocitos en la muestra y el porcentaje del DNA fragmentado. Mejorando de forma indirecta la capacidad fecundante en el factor masculino.

Aquellos pacientes con afectación en los parámetros seminales relacionados a la oli-asteno-terato-zoospermia no se pudo establecer una asociación con el porcentaje de fragmentación del DNA, quizá debido los pocos pacientes con esta alteración en tres parámetros seminales. En individuos con OAT y fragmentación del DNA (2/3), se pudiera establecer una relación de causa-efecto. Estos pacientes pudieran tener como origen del daño a la cromatina un problema obstructivo que condicionaría al espermatozoide su exposición a radicales libres de oxígeno y su posterior fragmentación del DNA.

En los pacientes estudiados no se tomaron en cuenta posibles causas del daño al DNA, únicamente se relacionan dos estudios de la muestra seminal para determinar su asociación (fragmentación del DNA espermático y espermatobioscopia directa).

CONCLUSION

Los resultados obtenidos demuestran una asociación posible de causa-efecto entre el porcentaje de la fragmentación del DNA y el número de leucocitos , susceptible de tratamiento. Su relación con la motilidad espermática sugiere otro mecanismo etiológico en la fragmentación del DNA, y que el tratamiento del origen del daño, incrementaría de manera importante la movilidad del espermatozoide. Ambas intervenciones a favor de mejorar la capacidad fecundante del espermatozoide. La comparación de los parámetros seminales convencionales de los criterios de la OMS 1999 y 2010 con el porcentaje de fragmentación del DNA no presentó diferencias, pese a el cambio importante de rangos de normalidad en la morfología del espermatozoide. No se pudo establecer una relación entre el oligo-asteno-terato-zoospermia y el porcentaje de fragmentación del DNA espermático. Aunque la mayoría de los pacientes con OAT presentaron daño de la cromatina espermática de manera significativa. La comparación de individuos con y sin tratamiento para una posible causa de la fragmentación del DNA , establecería otra aplicación práctica de este trabajo evaluando la capacidad fecundante del espermatozoide.

ANEXO : TABLAS Y GRAFICOS

Tabla 4. Fragmentación del DNA espermático vs volumen de la muestra seminal

| | Volumen \geq 1.5 ml. | Volumen $<$ 1.5 ml. | TOTAL |
|--------------------------|------------------------|---------------------|-------|
| Fragmentación \geq 30% | 23 | 14 | 37 |
| Fragmentación $<$ 30% | 44 | 16 | 60 |
| TOTAL | 67 | 30 | 97 |

p 0.266 - Prueba de Fisher.

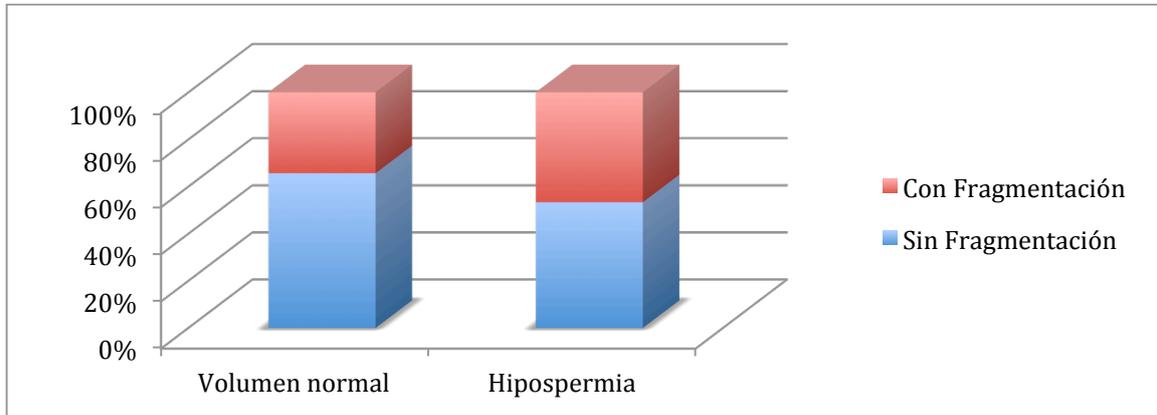


Tabla 5. Fragmentación del DNA espermático vs concentración de la muestra seminal

| | Concentración \geq 15 millones/ml. | Concentración $<$ 15 millones/ml. | TOTAL |
|--------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------|
| Fragmentación \geq 30% | 32 | 5 | 37 |
| Fragmentación $<$ 30% | 58 | 2 | 60 |
| TOTAL | 90 | 7 | 97 |

p 0.101- Prueba de Fisher.

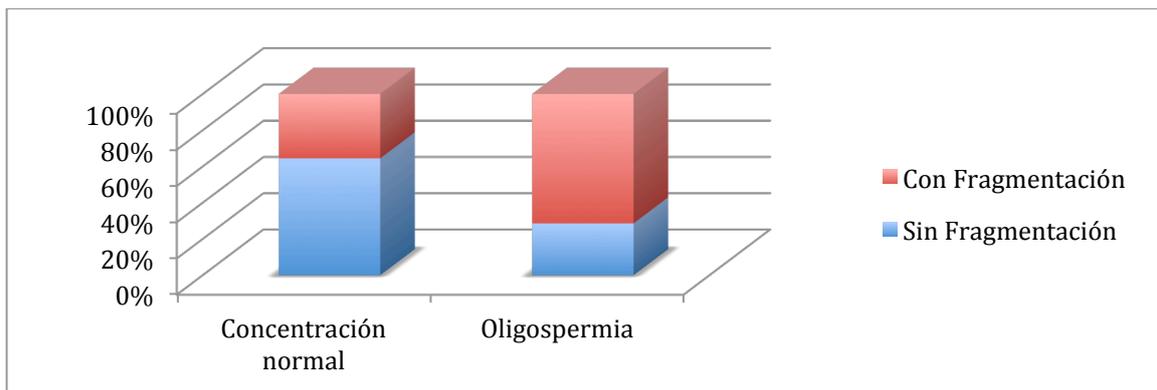


Tabla 6. Fragmentación del DNA espermático vs motilidad progresiva(PR) del espermatozoide

| | Motilidad PR \geq 32% | Motilidad PR < 32% | TOTAL |
|--------------------------|-------------------------|--------------------|-------|
| Fragmentación \geq 30% | 27 | 10 | 37 |
| Fragmentación < 30% | 53 | 7 | 60 |
| TOTAL | 80 | 17 | 97 |

p 0.062 – Prueba de Fisher.

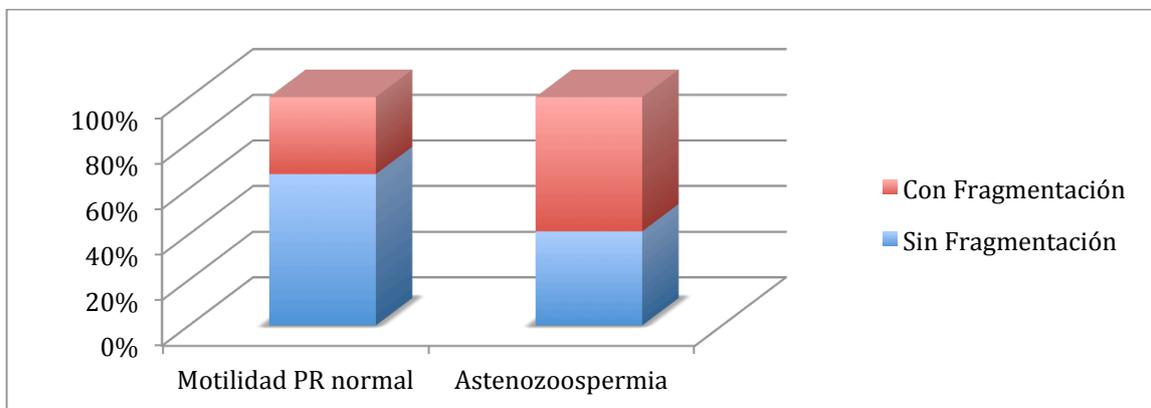


Tabla 7. Fragmentación del DNA espermático vs morfología del espermatozoide

| | Morfología \geq 4% | Morfología < 4% | TOTAL |
|--------------------------|----------------------|-----------------|-------|
| Fragmentación \geq 30% | 34 | 3 | 37 |
| Fragmentación < 30% | 56 | 4 | 60 |
| TOTAL | 90 | 7 | 97 |

p 1.000 – Prueba de Fisher.

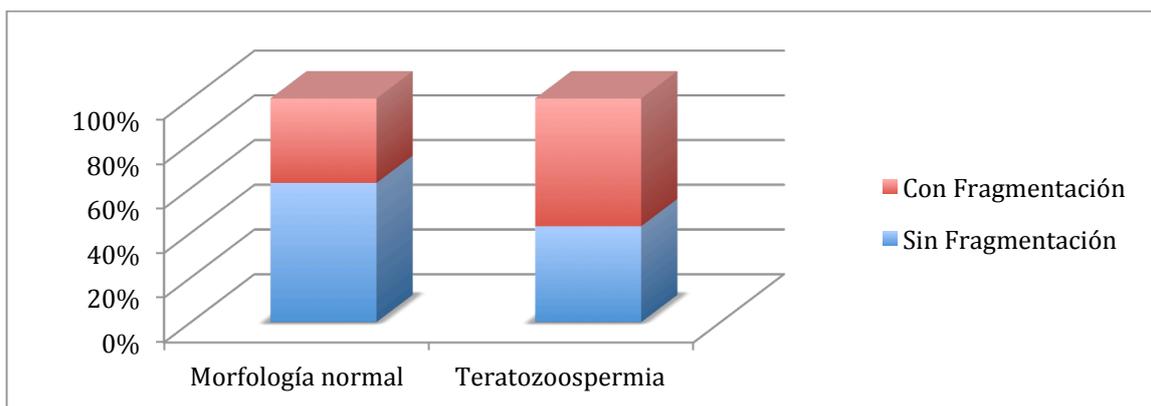


Tabla 8. Fragmentación del DNA espermático vs vitalidad del espermatozoide

| | Vitalidad \geq 58% | Vitalidad < 58% | TOTAL |
|--------------------------|----------------------|-----------------|-------|
| Fragmentación \geq 30% | 28 | 9 | 37 |
| Fragmentación < 30% | 46 | 14 | 60 |
| TOTAL | 74 | 23 | 97 |

p 1.000 – Prueba de Fisher.

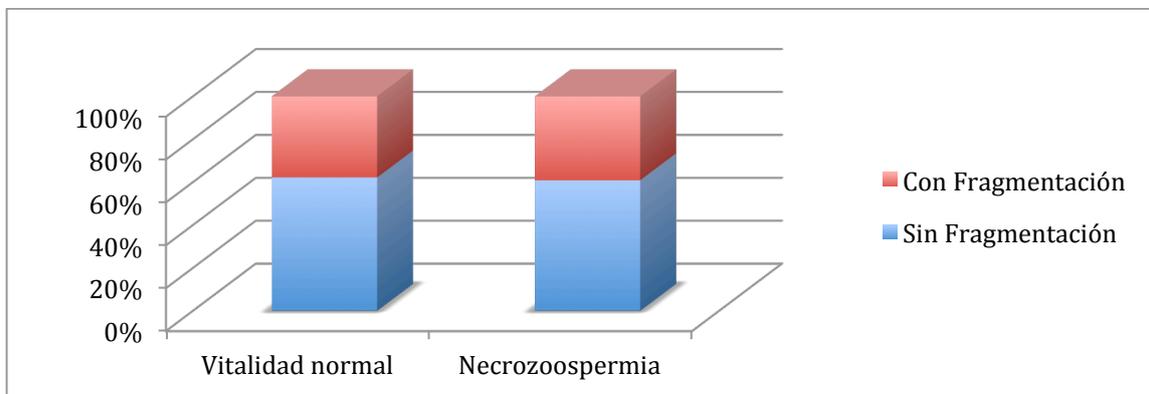
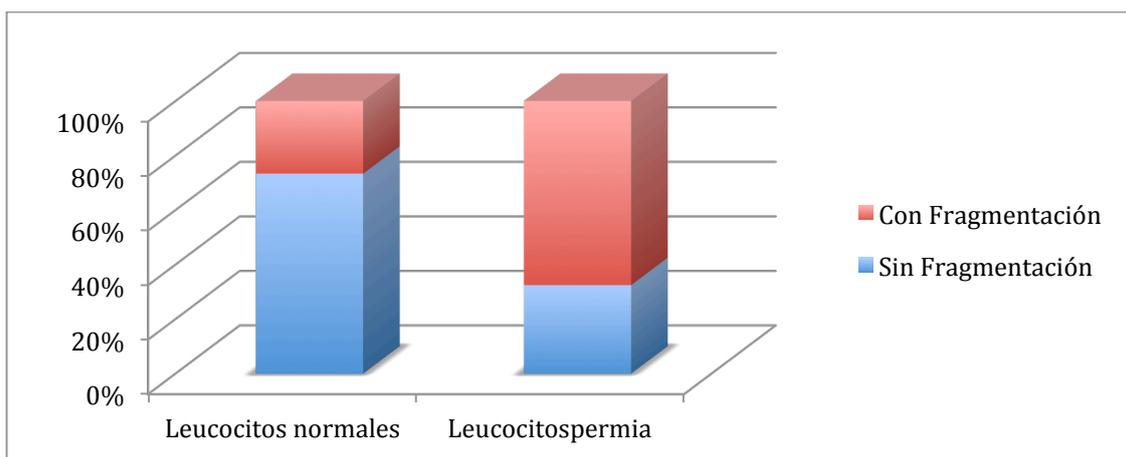


Tabla 9. Fragmentación del DNA espermático vs leucocitos en la muestra espermática.

| | Leucocitos \leq 1 millón/ml. | Leucocitos > 1 millón/ml. | TOTAL |
|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------|
| Fragmentación \geq 30% | 12 | 25 | 37 |
| Fragmentación < 30% | 33 | 27 | 60 |
| TOTAL | 45 | 52 | 97 |

p 0.030 – Prueba de Fisher.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- D. Stewart, et al. DNA Integrity in Human Spermatozoa. Relationship with Semen Quality. *J Androl* 2000;21:33-4.
- 2.- M. Bungum, et al. Sperm DNA integrity in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007; 22:174-79.
- 3.- R. Morales et al. Sperm DNA fragmentation and implications for fertility. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 2007;24:305-13.
- 4.- JF. Velez de la calle, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril* 2008; 90:1792-9.
- 5.- S. Mosskovtsev, et al. Sperm DNA damage correlation to Severity of Semen Abnormalities. *Urology* 2009;74:789-93.
- 6.- M. Smit, et al. Sperm chromatin structure is associated with the quality of spermatogenesis in infertile patients. *Fertil Steril* 2010;94:1748-52.
- 7.- WHO. Laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. 2010.
- 8.- Z. Li-hong, et al Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: Comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick-end labeling assay. *Fertil Steril* 2010;94:1027-32.
- 9.- D. Sakkas et al. Sperm DNA fragmentation: mechanism of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; 93:1027-36.
- 10.- M. Meseguet, et al. Effect of Sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2011;95:124-8.