



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**CORRELACION DE FRAGMENTACION DE ADN
ESPERMATICO Y DESARROLLO IN VITRO DE CALIDAD
EMBRIONARIA, TASAS DE EMBARAZO Y ABORTO EN
PAREJAS SOMETIDAS A CICLOS DE
REPRODUCCION ASISTIDA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN BIOLOGIA DE LA
REPRODUCCION HUMANA**

P R E S E N T A :

DRA. LINCY LAURA CRUZ SANCHEZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESUS DANIEL MORENO GARCIA**



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 mi hija Laura Carolina, a mis padres y hermanos
Por ser una apoyo constante en mi vida**

A mis asesores

Dr. Daniel Moreno García

Biol. Miguel Regalado

Dr. Raúl Eduardo Piña Aguilar

Por sus enseñanzas y apoyo invaluable

INDICE

| | |
|--------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 1.1. Problema | 6 |
| 1.2. Justificación | 8 |
| 1.3. Objetivos | 10 |
| 1.3.1. General | 10 |
| 1.3.2. Específicos | 10 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 11 |
| 3. METODOLOGÍA | 17 |
| 3.1. Lugar | 17 |
| 3.2. Diseño | 17 |
| 3.3. Grupo de estudio | 17 |
| 3.4. Tamaño de la muestra | 18 |
| 3.5. Variables | 19 |
| 3.6. Análisis de datos | 28 |
| 3.7. Descripción general del estudio | 33 |
| 3.8. Cronograma de actividades | 35 |
| 4. RESULTADOS | 29 |
| 5. CONCLUSIONES | 29 |
| 6. PROPUESTAS | 29 |
| 7. ANEXOS | 29 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 29 |

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo pretende correlacionar el grado de fragmentación de ADN espermático con la calidad embrionaria, las tasas de embarazo así como los abortos, que se obtiene en parejas que ameritan tratamientos de reproducción asistida.

En el abordaje del varón infértil, no se cuenta con métodos objetivos que evalúen la calidad espermática, actualmente solo contamos con los parámetros establecido por la OMS, en donde no se contempla la calidad de ADN. Por tal motivo en nuestra institución consideramos necesario evaluar el factor masculino; ya que como es conocido aporta el 50% de material genético para la obtención de un embrión, así mismo el grado de fragmentación puede estar relacionado con pérdida embrionaria temprana o un mal desarrollo embrionario y de esta forma se podría realizar una selección más adecuada para los pacientes candidatos para técnicas de reproducción asistida, o la elección oportuna para un método de selección espermática.

El presente trabajo muestra resultados importantes con respecto a los valores de fragmentación con los resultados de tratamientos de reproducción asistida y para intentar establecer un punto de corte a partir del cual se pueda predecir el resultado de las mismas, y de esta manera aumentar notablemente las tasa de éxito, reducir el número de ciclo innecesarios y conseguir finalmente una eficiencia mayor de la técnica de reproducción empleada lo que redonda no solo en mayores tasas de embarazo sino también menor costo.

Problema

Dentro de los parámetros recogidos por la Organización Mundial de la Salud ⁽¹⁾ en el análisis seminal no se contempla la integridad del ADN espermático, como tal, en diversos estudios se han encontrado una relación entre fragmentación de ADN espermático y pérdida de embarazo, por tal motivo en nuestro servicio de reproducción Humana es necesario evaluar este parámetro.

TABLE 1

Lower limits of the accepted reference values for semen analysis.

| On at least two occasions | Reference value |
|----------------------------------|--|
| Ejaculate volume | 1.5 mL |
| pH | 7.2 |
| Sperm concentration | 15×10^6 spermatozoa/mL |
| Total sperm number | 39×10^6 spermatozoa/ejaculate |
| Percent motility | 40% |
| Forward progression | 32% |
| Normal morphology | 4% normal |
| And | |
| Sperm agglutination | absent |
| Viscosity | ≤ 2 cm thread post-liquefaction |

Note: Data taken from World Health Organization, 2010 (10).

Practice Committee. Evaluation of the infertile male. Fertil Steril 2012.

1.1 Justificación

El análisis seminal convencional no permite predecir o correlacionar la calidad embrionaria, el desarrollo in vitro, in vivo ni las tasas de aborto. Nuevas herramientas de análisis seminal como es el estudio de la fragmentación del ADN espermático parecen ser un mejor indicador pronóstico en el desarrollo embrionario ya que se ha visto que en muestras seminales con alta fragmentación de ADN el desarrollo las tasas de embarazo son pobres y los abortos aumentan.

Por tanto con este estudio pretendemos conocer si la fragmentación de ADN puede ser una herramienta con fines pronósticos, en parejas sometidas a técnicas de reproducción asistida en el centro médico nacional 20 de Noviembre ISSSTE.

Ya que la población de pacientes atendidas en el centro médico nacional 20 de noviembre, se caracteriza por presentar condiciones de manejo difícil como es aborto recurrente, fallos de implantación, edad materna y paterna avanzada.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

Analizar el grado de fragmentación de muestras seminales en las parejas que serán sometidos a técnica de reproducción asistida y correlacionarlo con la calidad embrionaria, tasa de embarazo y de abortos

1.3.2 Específicos

- Estandarizar el análisis de fragmentación de ADN espermático, utilizando la técnica de dispersión de cromatina (SCD) con el kit comercial Halosperm.
- Obtener datos de ciclo de estimulación, desarrollo embrionario.
- Obtener tasas de embarazo y de abortos en las parejas estudiadas.
- correlacionar el grado de fragmentación de ADN espermático, con la calidad embrionaria y tasas de aborto.

2. MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES HISTORICOS FRAGMENTACION DE ADN

Aproximadamente en un 50 % de los casos que se estudian por infertilidad, corresponde a causa masculina,(2) De acuerdo a la Organización Mundial de la salud, se establecen parámetros básicos rutinarios en los que se estudia las características seminales como es volumen del eyaculado, concentración espermática motilidad y morfología y en algunos casos es visto que aunque la espermatozoscopia se encuentre dentro de parámetros normales no se consigue un embarazo,(3) por lo que en estos casos el origen de la infertilidad masculina podría deberse a otras causas como es alteraciones en la membrana del espermatozoide , factores genéticos, ambientales y por lo tanto no se detectan en el espermiograma.(9)

Los parámetros conocidos del líquido seminal presentan un alto grado de la diversidad biológica y son sólo medidas razonables de potencial de fertilidad y pobres predictores de resultados reproductivos.

Como tal, hay una necesidad de desarrollar nuevos marcadores que diferencien entre los hombres infértiles y fértiles, y ayudar a predecir el resultado del embarazo y los efectos adversos de los eventos reproductivos. (3)

La integridad del genoma paterno es de vital importancia para el inicio y mantenimiento para el inicio y mantenimiento de un embarazo viable a término tanto in vivo como in vitro, los espermatozoides de muestras de semen con daño moderado de ADN pueden fecundar eficientemente el ovulo. (11)

Sin embargo aún la pregunta que se plantea ¿Qué efectos en el desarrollo embrionario y fetal se derivan de la de la introducción en el genoma embrionario de daño de ADN proveniente del genoma paterno que no haya sido reparado por el ovocito después de la fecundación? Un número relativamente elevado de parejas no consiguen contener un embarazo a pesar de no existir una causa aparente de infertilidad como se ha comentado anteriormente. (12)

Todavía no se conoce lo suficiente la capacidad que tiene el ovocito al reparar el daño del ADN espermático y nuestro conocimiento actual se limita a un número reducido de estudios de expresión génica que muestran que el ovocito y el embrión están bien equipados con una serie de sistemas que les permite reparar ciertas anomalías provenientes del genoma paterno, se han encontrado estudios en donde fragmentación de menos de 8% puede ser reparada por el ovocito.(12)

La capacidad del ovocito de iniciar este proceso de reparación de ADN espermático depende de la calidad del genoma y citoplasma del mismo, que disminuye de manera drástica con el aumento de la edad de la mujer , en segundo lugar , la calidad del ADN espermático también parece empeorar con el incremento de la edad paterna, sobre todo a partir de los 45 años, y esto pudiera exacerbar la disminución en las tasa de embarazo observada en parejas de edad avanzada.(4)

Se ha postulado que la presencia de daño de ADN no reparado en el embrión por encima de un nivel crítico podría explicar al menos en parte, el fallo en el desarrollo embrionario y en especial del blastocisto, en embriones con un cariotipo normal.(13)

Estudios recientes sugieren que este tipo de daño se expresa durante o inmediatamente después de la implantación y ha sido caracterizado como efecto paterno tardío existe también evidencia de que niveles elevados de fragmentación de ADN se asocian con fallo en el desarrollo embrionario o blastocisto y se cree que en algunas de las pérdidas embrionarias se producen entre la activación del genoma paterno y el estadio del blastocisto.(10)

Cabe puntualizar que no todo el daño del ADN presente en el embrión se deriva del espermatozoide que haya fecundado el ovocito, algunas anomalías en el ADN embrionario pueden derivarse también del ovocito.(9)

Si tomamos como ejemplo las aneuploidias embrionarias, el ovocito es responsable en un elevado porcentaje de los casos de las anomalías cromosómicas encontradas en el embrión, pero no en todos los casos ya que el espermatozoide también podría contribuir a las aneuploidias que pueden estar presentes en el embrión, en el futuro el desarrollo de nuevas técnicas quizá permita el estudio combinado de alteraciones cromosómicas y de daño en el ADN espermático y del embrión,(7) una de las estrategias que se contemplan en el centro médico 20 de noviembre es correlacionar el porcentaje de la fragmentación de ADN espermático con la calidad embrionaria ya que como se ha comentado anteriormente la integridad de ambos gametos es fundamental para un mejor resultado.

¿Cómo se genera daño, de ADN espermático?

El daño de al ADN en los espermatozoides puede afectar el ADN mitocondrial y el ADN nuclear y puede ser generado por 6 mecanismos ya conocidos los cuales pueden ocurrir durante la producción o el transporte de las células espermáticas e incluyen :

- 1) apoptosis durante el proceso de espermatogénesis;
- 2) roturas en las cadenas de ADN producidas durante la remodelación de la cromatina espermática durante el proceso de espermiogénesis;
- 3) fragmentación posttesticular del ADN inducida principalmente por radicales de oxígeno (incluidos el radical hidroxil y óxido nítrico) durante el transporte espermático a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo;
- 4) fragmentación del ADN inducida por caspasas endógenas y endonucleasas, y
- 6) daño al ADN inducido por tóxicos ambientales.(5,6,12,)

De estos seis mecanismos, 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 espermático.(6)

Esto está apoyado por informes previos que demuestran que la fragmentación del ADN es mayor en el esperma epididimal caudal y eyaculado en comparación con los espermatozoides testiculares.(12, 14)

Durante las pasadas dos décadas se introdujo una serie de pruebas para el análisis de la fragmentación del ADN espermático. Estas pruebas incluyen TUNEL,cometa,CMA3,traducción de cortes *in situ*,DBD-FISH(hibridación *in situ* de fluorescencia para detección de roturas de ADN)prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD, por sus siglas en inglés) y SCSA., de estas pruebas se pueden dividir en dos

1) pruebas que miden el daño al ADN directamente, como TUNEL, ISNT, o cometa a pH neutro, y 2) pruebas que miden el daño al ADN después de la desnaturalización, como SCSA, SCD y cometa a pH ácido o alcalino.(10,12,)

En la actualidad es sabido que el grado de daño al ADN es medido por citometría de flujo y se expresa como índice de fragmentación del ADN o IFA. , en estudios previos indican que un valor IFA > 27% se asocia con falla de embarazo en tecnología de reproducción asistida. (10, 12, 6)

Las pruebas de la cromatina espermática y la integridad del ADN puede ayudar en el diagnóstico de la infertilidad se ha informado de que las pruebas de cromatina de los espermatozoides y daños en el ADN puede ayudar a predecir los resultados reproductivos después utilizar técnicas de reproducción asistida, sin embargo el valor de estas pruebas en la clínica aún no ha sido demostrada. (10, 12, 1

Actualmente se ha revolucionado el tratamiento de la infertilidad masculina con la fertilización in vitro (FIV) con intra-citoplasmática espermatozoides (ICSI), los hombres con oligozoospermia severa, azoospermia obstructiva y no obstructiva puede esperar hijos; aun no existe en la literatura la correlación entre el grado de fragmentación de ADN espermático y desarrollo embrionario. (12, 13)

Se han realizado varios trabajos que evidencian la relación que existe entre la integridad del ADN espermático y la fertilidad y en ellos se demuestra que en los varones infértiles tiene mayor fracción de ADN con una relación existente entre la integridad del ADN espermático. (8, 11, 12)

Existen 4 parámetros en los que se basa para el porcentaje de fertilización.

- excelente si DFI < 15%
- alto si DFI 15-24%
- bajo si DFI 25-30%

- muy bajo si DFI > 30%.

Por tal motivo en el centro medio 20 noviembre planteamos la necesidad de realizar un estudio más profundo en el varón, de tal modo que nos permitiría correlacionar los resultados de fragmentación con la calidad embrionaria así como número de embarazos en paciente mexicanos con oligospermia, leucospermia o con antecedente de inseminaciones fallidas o abortos de repetición).

Porcentaje de Fragmentación ADN espermático: porcentaje de espermatozoides fragmentados usando Halosperm y contando 200 espermatozoides.

Ciclo de reproducción asistida: parejas que serán sometidas a ciclos de inseminación intrauterina homologa y ciclos de fertilización in vitro (ICSI).

Desarrollo embrionario in vitro: tasa de fertilización, embriones que forman pronúcleos /ovocitos fertilizados. Tasa de división: embriones de división entre embriones fertilizados al día 3

Calidad embrionaria: características que nos revelen el potencial del embrión para implantar y dar lugar a un embarazo.

Tasa embarazo: porcentajes de pacientes con gonadotropina coriónica en día 15 postransferencia mayor a 12u/ml

Tasa aborto: Porcentaje de pacientes con gonadotropina positiva que no se detecto latido fetal a la 8 semana, o perdida del producto antes de la 12 semanas

Porcentaje de Fragmentación ADN espermático: porcentaje de espermatozoides fragmentados usando Halosperm y contando 200 espermatozoides.

Ciclo de reproducción asistida: parejas que serán sometidas a ciclos de inseminación intrauterina homologa y ciclos de fertilización in vitro (ICSI).

Desarrollo embrionario in vitro: tasa de fertilización, embriones que forman pronúcleos /ovocitos fertilizados. Tasa de división: embriones de división entre embriones fertilizados al día 3

Calidad embrionaria: características morfológicas valoradas en día 2, según los criterios que son indicadores que nos revelen el potencial del embrión para implantar y dar lugar a un embarazo.

De acuerdo a la clasificación morfológica y de división celular como a continuación se detalla:

Tabla 28-1. Clasificación morfológica de embriones en el tercer día de desarrollo según el potencial implantacional y su posible correlación con la clasificación morfológica de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR)

| Clasificación por potencial | Tasa teórica de implantación | Destino | Clasificación ASEBIR | Descripción ASEBIR |
|-----------------------------|------------------------------|--|----------------------|---|
| Óptimos | > 25 % | Transferir o congelar | A | Embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación |
| | | | B, C | Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación |
| Subóptimos | 1-25 % | Transferir si no hay alternativa Congelar como acompañante Dejar en observación hasta el día 5-6 | C, D | Embrión regular con una probabilidad de implantación media o baja |
| No viables | < 1 % | Desechar | D | Embrión de mala calidad con una probabilidad de implantación nula |

Tabla 28-2. Agrupación del tipo embrionario en función de la evolución de la división celular, de mejor a peor tasa de implantación según la clasificación morfológica de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR)

| Grupo de calidad ASEBIR | Células observadas en el segundo día de desarrollo embrionario <i>in vitro</i> | Células observadas en el tercer día de desarrollo embrionario <i>in vitro</i> |
|-------------------------|--|---|
| A | 4 | 7, 8 |
| B | 2 o 5 | 7 o más |
| | 4 | 9 o más |
| C | 2 o 4 | 6 |
| | 6 | 8 o más |
| | 3 | 6 o más |
| D | Más de 6 | Cualquier número |
| | Cualquier número | Sólo 1 célula más que en D2 |
| | Cualquier número | 5 o menos |

Tasa embarazo: porcentajes de pacientes con gonadotropina coriónica en día 15 postransferencia mayor a 12uml

Tasa aborto: Porcentaje de pacientes con gonadotropina positiva que no se detecto latido fetal a la 8 semana, o perdida del producto antes de la 12 semanas.

3. METODOLOGÍA

3.1 Lugar de realización y Diseño del estudio

El presente estudio se plantea como un estudio del tipo prospectivo de correlación que permitirá conocer la relación entre fragmentación de ADN espermático, y calidad embrionaria, tasas de embarazo y abortos en parejas sometidas a técnicas de reproducción asistida en el Centro Médico Nacional -20 de Noviembre

3.3 Grupo de estudio

Pacientes con antecedente de infertilidad que serán sometidos a técnicas de reproducción asistida

Se excluirán a los hombres los que durante la evaluación se documenten las siguientes condiciones:

1. Diabetes mellitus.
2. Hepatitis B,C
3. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
4. Varicocele importante (grado 3 y 4)
5. Presencia de infección por *Chlamydia*.
6. Cáncer testicular u otra patología oncológica que en su tratamiento incluyera quimioterapia y/o radioterapia previa.
7. Se excluirán pacientes con datos que apoyen azoospermia obstructiva.

Pacientes que serán sometidas a ciclos que incluyan diagnóstico genético preimplantacional, maduración in vitro, y o otros procedimientos de manipulación embrionaria

Se eliminaran pacientes que no completen el protocolo completo de estudio o que en cualquier momento no quieran continuar siendo parte del estudio.

3.4 Tamaño de la muestra

El presente estudio se plantea como un estudio del tipo prospectivo de correlación que permitirá conocer la relación entre fragmentación de ADN espermático, y calidad embrionaria, tasas de embarazo y abortos en parejas sometidas a técnicas de reproducción asistida en el Centro Médico Nacional -20 de Noviembre”.

3.5 Variables

Para la obtención de la información, se uso una herramienta en donde contempla edad del paciente, espermatobioscopia, porcentaje de fragmentación de adm, embarazo , perdida de embarazo e indicación de fragmentación

| edad | Fragmen taciÓn % | EBD | CALIDA D EMBRIO NARIA | EMBA RAZO | ABO RTO | ANTECEDE NTES |
|--------------|------------------------|---|---|----------------|------------|------------------------------------|
| 29 33 | 15 | DENSIDAD :20 MILLONES VOL 2.3,A+B:35 % NORMALE S 78% | NO SE CAPTUR AON OVOCIT OS | | | 3 INSEMINA CIONES PREVIAS |
| | | | | | | |
| 3 | 38 | 5% | VOLUMEN 6 VITALIDAD 65% MOVILIDAD 82% DENSIDAD 55 MILLO | FALTA CICLO | | 3 INSEMINA CIONES, |

| | | | | | | | |
|---|-------------------|----|---|---|--------------------|--|--|
| | 38 | | NES | | | | |
| 4 | 37 38 | 15 | VOLUMEN:3.6, MOVILIDAD 58%, NORMALES 2% PROGRESION b,c | SE CAPTUR AN 14 OVOCIT OS SE TRASNF IEREN 1- 8 CEL 10% DE FRAGM ENTACION CALIDAD 2+ 2- 6 CELULAS 10% FRAGM ENTACION CALIDAD 2+ 3- 6 CELULAS 30% FRAGM ENTACION CALIDAD 3+ | NO EMBA RAZO | | 3 INSEMINA CIONES |
| 5 | 41 | 20 | VOLUMEN 2.0 MOVILIDA D 55% MOTIL IDAD b,c CONCENT RACION 69 MILLONES | SE CAPTUR AN 3 OVOCIT OS SE ARREST AN EMBRIO NES | | | 3 INSEMINA CIONES |
| 6 | 33 32 AÑOS | 10 | VOLUMEN 3.5, MOVILIDA D41%, NORMALE S:3% MOTILIDA D B,C CONCENT RACION 6 MILLONES | SE OBTIENE 4 OVOCIT OS ICSI, 2 EMBRIO NES 3 CEL 2+, 3 ,3+ | NO EMBA RAZO | | 3 INSEMINA CIONES 2 FIVTE FALLIDOS |
| 7 | 45 | 26 | VOLUMEN 1.6 MOVILIDA D51%, | Se capturan 6 ovocitos, | | | |

| | | | | | | |
|--|--------------|----|--|-------------------------------------|--|--|
| | 35 | | MOTILIDAD B,C CONCENTRACION 18 MILLONES NORMALES 7% | se arrestan embriones | | |
| | 36 | 9 | VOLUMEN 2.0 MOVILIDAD 59% MOTILIDAD B,C DENSIDAD 29 MILLONES | Falta ciclo | | |
| | 35 | 40 | VOLUMEN 3.2 MOVILIDAD 55% NORMALES 6% DENSIDAD 46 MILLONES | Falta ciclo | | |
| | 46 31 | 10 | VOLUMEN 4.2, MOVILIDAD 55% NORMALES 5% PROGRESION BC, DENSIDAD 76 MILLONES | Dos ovocitos NO FERTILIZAN | | |
| | 41 36 | 28 | VOL 2.7 MOVILIDAD 28, MOTILIDAD C,D NORMALES 3% CONCENTRACION 5 MILLONES | 4 ovocitos no fertilizan | | |

| | | | | | | |
|--|----------|-----|---|---|---|--|
| | 41 | 12 | VOLUMEN 1.0 MOVILIDA D37%, MOTILIDA D CYD NORMALES 2% CONCENTR ACION 52 MILLONES | Falta ciclo | | |
| | 39 40 | 9 | VOLUMEN 2.0, MOVILIDA D 57% MOTILIDA D B,C MNORMAL ES 6% CONCENTR ACION 72 MILLONES | 2 ovocitos 4 celulas calidad 3 + | Perdida embaraz o a las 14 semanas | |
| | 40 39 | 24 | VOLUMEN 2.5 MOVILIDA D 58%, MOTILIDA D BC NORMALES 3%, CONCETRA CION 120 MILLONES | 4 OVOCIT OS 2 CELUL AS CALIDA D 3+ | NO EMBAR AZO | |
| | | 36% | VOLUMEN 2.0 MOVILIDA D 50% MOTILIDA DB,C NORMALES 3% CONCENTR ACION 58 MILLONES | | | |

| | | | | | |
|--|----|---|--|--|--|
| | 67 | VOL 2.5 ML, MOVILIDA D54 MOTILIDA D B,C NORMALES 5% DENSIDAD 52 MILLONES | | | |
| | 52 | VOLUMEN 2.0 MOVILIDA D 59% MOTILIDA D B,C NORMALES 2% CONCENTR ACION 8 MILLONES | | | |
| | 40 | VOLUMEN 2.0, MOVILIDA D585, MOTILIDA D B,C NORMALES 7% DENSIDAD 53 MILLONES | | | |
| | 6 | VOLUMEN 2.0, MOVILIDA D 68%, MOTILIDA D B,C, NORMALES 2% CONCENTR ACION 63 MILLONES | | | |
| | 16 | VOLUMEN 3.0 | | | |

| | | | | | | |
|--|--|----|---|--|--|--|
| | | | MOVILIDA D 85% MOTILIDA D A, NORMALES 5% CONCETRA CION 26 MILLONES | | | |
| | | 57 | VOLUMEN 3.0 MOVILIDA D 40% MOTILIDA D B,C, NORMALES 5% CONCENTR ACION 37 MILLONES | | | |
| | | 19 | VOLUMEN 3.0 MOVILIDA D 55% MOTILIDA D B,C NORMALES 4% CONCENTR ACION 84 MILLONES | | | |
| | | 27 | MOVILIDA D 49% MOTILIDA D B,C NORMALES 5% CONCENTR ACION 27 MIOLLONE S | | | |
| | | 16 | VOL 2.3, MOVILIDA D 58%, MOTILIDA D B,C, | | | |

| | | | | | | |
|--|--|-----|---|--|--|--|
| | | | NORMALES 4% CONCENTRACION 115 MILLONES | | | |
| | | 26% | VOLUMEN 3.0, MOVILIDA D65%, MOTILIDA D B.C CONCENTRACION 46 MILLONES NORMALES 2% | | | |
| | | 52 | VOLUMEN 8.0, MOVILIDA D48% MOTILIDA D BC, NORMALES 3% CONCENTRACION 80 MILLONES | | | |
| | | 66 | VOLUMEN 8.5 MOVILIDA D 38% MOTILIDA D B,C NORMALES 2% CONCENTRACION 47 MILLONES | | | |
| | | 26 | VOLUMEN 5.0, MOVILIDA D72%, MOTILIDA D B,C CONCENTRACION 123 | | | |

| | | | | | | |
|--|--|----|---|----------------|--|--|
| | | | MILLONES | | | |
| | | 22 | VOLUMEN 1.1 MOVILIDA D 51% MOTILIDA D B,C CONCENTR ACION 90 MILLONES | | | |
| | | 55 | VOLUMEN 5.3, MOVILIDA D88% MOTILIDA D B,C CONCENTR ACION 8 MILLONES | | | |
| | | 50 | VOLUMEN 3ML, MOVILIDA D70% MOTILIDA D B,C CONCENTR ACION 68 MILLONES | | | |
| | | 67 | VOLUMEN 2.5 ML MOVILIDA D 25%, MOTILIDA D B,C CONCENTR ACION 3 MILLONES | Falta ciclo | | |

3.7 Recursos

Resultados

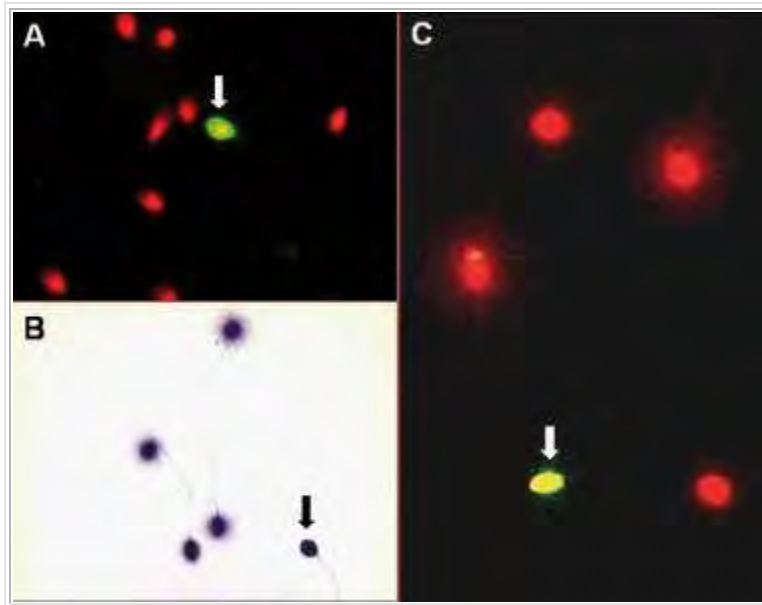
Se estudió un total de 62 varones. La edad promedio del grupo control fue de 25 años (rango 17-35 años), mientras que las edades del grupo de estudio fluctuaron entre los 40 y 56 años con una edad promedio de 48 años.

Las características seminales de los grupos estudiados se muestran en la [Tabla 1](#). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores promedios de los parámetros seminales convencionales. Sin embargo, 23% de los individuos mayores presentaron valores anormales ($< 14\%$) de morfología estricta. En el grupo control este valor fue de sólo 10%.

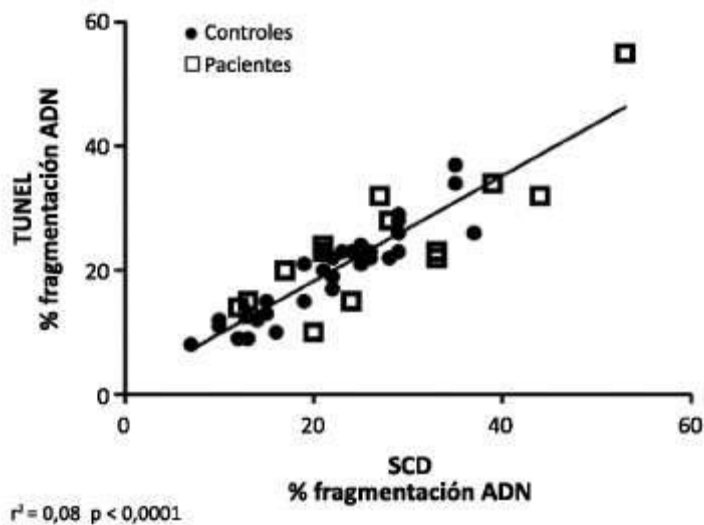
Tabla 1. Características seminales en sujetos controles e individuos mayores

| | Grupo Control | | Grupo de estudio | |
|--------------------------------|---------------|-------------|------------------|-------------|
| | Promedio | (Rango) | Promedio | (Rango) |
| Edad | 25 ± 0,8* | (17 - 35) | 48 ± 0,7 | (40 - 56) |
| Volumen (ml) | 3,1 ± 0,23 | (0,9 - 6,0) | 2,8 ± 0,25 | (0,5 - 5,8) |
| Concentración (millón/ml) | 98 ± 11 | (27 - 220) | 88 ± 14 | (10 - 290) |
| Movilidad progresiva (%) | 68 ± 1,5 | (52 - 84) | 65 ± 2,5 | (20 - 84) |
| Células redondas (millón/ml) | 2,3 ± 0,39 | (< 1 - 8,0) | 1,3 ± 0,17 | (< 1 - 5,6) |
| Morfología normal estricta (%) | 18 ± 0,84 | (7 - 27) | 17 ± 1,0 | (5 - 27) |

En la [Figura 1](#) se muestran micro fotografías de espermatozoides con ADN normal y fragmentado evaluados a través de los ensayos de TÚNEL (A) y SCD (B). Al realizar ambos ensayos simultáneamente sobre la misma placa, utilizando microscopía confocal, las células positivas para TÚNEL se observaron sólo en aquellos espermatozoides que no presentaban halo (fragmentados).



Al relacionar los porcentajes de daño en el ADN, evaluados a través de las técnicas de TÚNEL y SCD, se observó una correlación positiva significativa entre ambos ensayos (Figura 2).



Discusión

El efecto de la edad paterna sobre la fertilidad constituye actualmente un tópico de interés en salud pública, debido a que las estadísticas de nacimiento demuestran que un número cada vez mayor de varones escogen ser padres a edades más avanzadas (> 40 años)²⁸.

Una característica particular del semen humano es su baja calidad, que se manifiesta en una alta proporción de espermatozoides de baja movilidad, mala morfología y una alta incidencia de daño en el ADN nuclear y mitocondrial. Diversos estudios clínicos indican que el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN, está significativamente correlacionado con la tasa de embarazo tanto *in vivo* como *in vitro*^{15,17,18}. Algunos de estos estudios han definido valores de corte, para algunos ensayos, que permiten discriminar entre individuos fértiles e infértiles y pueden ser determinantes en el tratamiento de la pareja infértil, como por ejemplo, en la recomendación de un procedimiento de reproducción asistida más adecuado.

La determinación de la fragmentación del ADN agrega información de mayor valor predictivo al análisis de semen convencional y la evidencia de la literatura parece justificar que el análisis de este parámetro debería incluirse en la evaluación de rutina de la infertilidad masculina en las siguientes situaciones: (i) parejas infértiles con factor masculino alterado o infertilidad idiopática; (ii) pacientes con alteraciones endocrinas/andrológicas que requieren evaluación en respuesta a determinados tratamientos; (iii) pacientes de edad avanzada que consultan por infertilidad; iv) pacientes con indicación de reproducción asistida de alta complejidad y (v) muestras de espermatozoides criopreservadas.

El objetivo de este estudio fue determinar si la integridad del ADN espermático se modifica con la edad del individuo. Nuestros resultados demostraron un aumento significativo de este daño en varones mayores de 40 años. En el grupo control, el límite superior de espermatozoides fragmentados fue de 37%. En el grupo mayor, 68% de los varones presentaron porcentajes de fragmentación mayores al rango normal de referencia (20% TÚNEL +), con un límite superior de 55% de espermatozoides dañados. El promedio de los parámetros seminales convencionales fueron similares en ambos grupos.

La asociación entre el aumento de daño genómico en los espermatozoides y la edad del varón constituye en la actualidad un tópico de gran interés debido al riesgo potencial de transmitir el daño genético a la descendencia^{3,5}. Wyrobeck y col, en un grupo bien caracterizado (no fumador) de 97 varones entre 22 y 80 años demostraron una clara asociación entre el incremento de la edad del individuo, porcentaje de fragmentación del ADN, daño a la cromatina y mutaciones genéticas. Mientras que la incidencia de aneuploidías/diploidías no se asoció con la edad del varón⁴. Por otra parte, Slotter y col, utilizando una nueva estrategia de hibridación del ADN (*ACMsperm FISH assay*), demostraron que la edad paterna avanzada se asociaba a una mayor incidencia de rupturas, duplicaciones y deleciones del cromosoma 1 (particularmente 1p36 y 1q12) en los espermatozoides²⁹. Se ha reportado que 80% de las anomalías cromosómicas estructurales que se manifiestan durante el desarrollo o al nacimiento son de origen paterno³⁰⁻³². Recientemente, Belloc y col¹⁰ demostraron, en 17.000 ciclos de inseminación intrauterina, que no sólo la edad materna avanzada sino también la paterna tenían un profundo impacto negativo en las tasas de embarazo y aborto con diferencias significativas a partir de los 40 años.

En el presente estudio, la fragmentación del ADN nuclear se determinó a través de los ensayos de TÚNEL y SCD. El TÚNEL es ampliamente utilizado en la literatura y en general existe consenso, que porcentajes superiores a 20% de espermatozoides positivos para TÚNEL se asocian a ausencia de embarazo con 100% de especificidad³³. Esta técnica utiliza microscopía de fluorescencia o citometría de flujo, estas son metodologías complejas y de alto costo lo que limita su uso en el laboratorio de diagnóstico de rutina. Recientemente, un grupo español²⁴ desarrolló el ensayo de dispersión de la cromatina espermática (SCD) que utiliza microscopía de campo claro disponible en cualquier laboratorio. Ambos ensayos presentan la ventaja adicional que permiten evaluar cada espermatozoide de la población en forma individual pudiendo aplicarse a muestras con bajo número de espermatozoides. Al comparar los resultados obtenidos por TÚNEL y SCD, en la misma muestra, se observó que esta nueva técnica se correlaciona positiva y significativamente con ensayos de mayor complejidad y costo como el TÚNEL. Aun cuando faltan estudios para establecer los valores de referencia que permitan discriminar pacientes fértiles de infértiles, su implementación en el estudio de rutina del factor masculino de infertilidad, mejorará el valor predictivo de los espermiograma convencionales aplicados en Chile.

Conclusión

La tendencia actual a ser padres en la madurez se asocia a una disminución de la integridad genética de los espermatozoides. Los individuos mayores de 40 años presentaron un aumento de la fragmentación en el ADN espermático que podría explicar la reducción de la fertilidad reportada en este grupo etario.

La metodología de SCD es sencilla de realizar, rápida y requiere de instrumentos de laboratorio de fácil acceso. Además, es de bajo costo y se correlaciona con técnicas existentes de mayor complejidad y costo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Armand Zini. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? Division of Urology, Department of Surgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2011, 57: 78–85
- 2.- FEMEGO . Evaluación, diagnóstico y tratamiento del varón infértil. *Ginecol Obstet Mex* 2011;79(11):746-753
- 3.- Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama . VOL. 98 NO. 2 / AUGUST 2012
- 4.- Andreas Jungwirth a,* , Aleksander G ET AL. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *EUROPEAN UROLOGY* 62 (2012) 324 – 332
- 5.- The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, Vol.0, No.0 pp. 1–10, 2012
- 6.- DAVID MORTIMER AND ROELOF M. Sperm Morphology Andrology Lab Corner Assessment—Historical Perspectives and Current Opinions. *Journal of Andrology*, Vol. 22, No. 2, March/April 2001
- 7.- Jaime Gosálvez Berenguera, Pedro Caballero. Fragmentación del ADN espermático. *Rev Int Androl.* 2008;6(3):193-209
- 8.- José Luis Fernández, M.D., Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility_ Vol. 84, No. 4, October 2005*
- 9.- KAZIM R. CHOCHAN,* JEANINE T. Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *Journal of Andrology*, Vol. 27, No. 1, January/February 2006
- 10.- José Luis Fernández, M.D., Ph.D., a,b Lourdes Muriel, Halosperm® is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility_ Vol. 84, No. 4, October 2005.*
- 11.- Marcos Meseguer, Ph.. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility_ Vol. 95, No. 1, January 2011*
- 12.- Denny Sakkas,. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility_ Vol. 93, No. 4, March 1, 2010*
- 13.- M. Mehdi, Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa:

correlation with semen parameters. 2009 Blackwell Verlag GmbH *Æ Andrologia* 41, 383–386

14.- Marzeyeh Tavalae. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome, *Fertility and Sterility_ Vol. 91, No. 4, April 2009*