



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

ASOCIACIÓN ENTRE EL INTERVALO DE LA
ABSTINENCIA SEXUAL Y LA FRAGMENTACIÓN DEL
ADN ESPERMÁTICO EN PACIENTES CON
LEUCOCITOSPERMIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
HUMANA

P R E S E N T A

Dr. RICARDO ALBERTO PONCE DE SEDAS

TUTOR: DR. HECTOR SALVADOR GODOY
MORALES
HOSPITAL ANGELES DEL PEDREGAL
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2014



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.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
MATERIALES Y MÉTODOS	5
ANÁLISIS DE SEMEN	6
DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN	6
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	7
RESULTADOS	7
DISCUSIÓN	8
BIBLIOGRAFÍA	9
ANEXOS	10
TABLAS	10
TABLA I. MEDIA (DESVIACIÓN ESTÁNDAR) DE TODAS LAS VARIABLES CONSIDERADAS EN PACIENTES CON Y SIN LEUCOCITOSPERMIA.	10
TABLA II. CORRELACIÓN BIVARIADA ENTRE LA SDF Y LA ABSTINENCIA EN PACIENTES CON Y SIN LEUCOCITOSPERMIA (COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON)	11
FIGURAS:	12
FIGURA 1: DIAGRAMA DE DISPERSIÓN DE PUNTOS DE LA SDF Y ABSTINENCIA DE 66 PACIENTES SIN LEUCOCITOSPERMIA	12
FIGURA 2: DIAGRAMA DE DISPERSIÓN DE PUNTOS DE LA SDF Y ABSTINENCIA DE 86 PACIENTES CON LEUCOCITOSPERMIA	13

RESUMEN

Objetivo: Describir la relación entre la duración de la abstinencia sexual y el porcentaje de fragmentación del ADN espermático.

Diseño: Estudio descriptivo, retrospectivo, observacional.

Entorno: Unidad de reproducción asistida privada.

Intervención: Ninguna

Principales resultados medidos: porcentaje de fragmentación del ADN espermático y el tiempo de abstinencia sexual antes de la toma del eyaculado.

Resultados: Se observaron niveles más bajos de la fragmentación del ADN en pacientes con menor abstinencia en presencia de leucocitospermia en la espermatobioscopia directa.

Conclusiones: El tiempo de abstinencia sexual inmediatamente antes de una colección de esperma se correlaciona directamente con el grado de fragmentación de ADN de esperma en pacientes con leucocitospermia. Esta relación podría explicarse por la exposición prolongada de los espermatozoides de un ambiente rico en especies oxidativas reactivas (ROS) como en el caso de una infección testicular.

Palabras clave: fragmentación de ADN del esperma, la abstinencia sexual, factor masculino, calidad del esperma.

INTRODUCCIÓN

El espermatozoide es responsable de entregar el genoma paterno para el ovocito en el momento de la fecundación. El éxito del proceso de reproducción depende de la integridad del material de ADN, ya sea de origen materno o paterno. Existen varios tipos de daño en el gameto masculino que incluyen aberraciones cromosómicas, modificaciones epigenéticas en las colas de histona y el ADN, mutaciones, oxidación de bases y la fragmentación del ADN del espermatozoide (SDF). [1] La causa más frecuente de transmisión paterna de anomalías del ADN a la progenie es SDF, ya que está presente en alto porcentaje de espermatozoides de hombres subfértiles e infértiles. La exposición a los componentes tóxicos en los fumadores frecuentes, la radioterapia o la quimioterapia también puede conducir a mayor porcentaje de SDF. [2] SDF puede tener su origen en los testículos, o puede ocurrir como consecuencia de diferentes insultos después de la espermiación y durante el tránsito en el tracto genital masculino. El daño del ADN en los espermatozoides es principalmente el resultado del estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por los leucocitos [3], por lo tanto, infecciones genitourinarias pueden servir como una fuente potencial de ROS. En tratamientos de reproducción asistida (ART), se suele recomendar 3 - 4 - día de abstinencia antes de la inseminación, aunque no hay pruebas científicas claras de que esta práctica es útil para lograr un mayor éxito reproductivo. El objetivo de este estudio fue describir la relación entre la duración de la abstinencia sexual y el porcentaje de fragmentación de ADN de espermatozoides en los pacientes masculinos subfértiles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo observacional de 152 muestras de semen obtenidas de pacientes infértiles que fueron evaluados en la Unidad de Medicina Reproductiva del Hospital Ángeles del Pedregal, México. Las muestras de semen se obtuvieron como se describe y fueron analizadas en nuestro laboratorio de andrología. Se creó una base de datos de Excel que contiene los parámetros del semen y el porcentaje de fragmentación de ADN del espermatozoide. Se utilizaron los criterios de normalidad de los parámetros seminales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2010. Más de un millón de leucocitos (células peroxidasa positivas) por mililitro de eyaculado, se definió como leucocitospermia. [4] Se utilizó una técnica de dispersión de la cromatina (SCD) para evaluar la fragmentación del

ADN, $\geq 30\%$ se utilizó como el valor de corte. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

Análisis de Semen

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación después de un período variable de abstinencia. Todas las muestras se dejaron para licuar a 37°C durante 60 minutos antes de ser evaluadas de acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud. [4] Las siguientes variables fueron tomadas en cuenta: volumen del eyaculado (ml), la concentración de espermatozoides ($\times 10^6/\text{ml}$), el número total de espermatozoides ($\times 10^6/\text{eyaculado}$), la motilidad (%), morfología (% de formas normales), la viabilidad (%) y el pH.

Determinación de la Integridad del ADN

Cada muestra de semen se mezcló con 5-6 ml de medio de fluido tubárico modificado humano (MHTF) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) en relación 1:2, en un tubo de centrífuga. Después suavemente invirtiendo el tubo de centrífuga de tres a cinco veces, se centrifugó durante 10 minutos a $300 \times g$. Posteriormente se realizó un segundo lavado, se retiró el sobrenadante, y el pellet de esperma se resuspendió en medio MHTF a una concentración de $10\text{-}20 \times 10^6$ espermatozoides por mililitro. Cada muestra se dividió en alícuotas y una alícuota se utilizó para la prueba de daño en el ADN por SCD.

Brevemente, la muestra de esperma lavado se mezcló con 1% (peso/vol) de agarosa de bajo punto de fusión (para obtener una concentración final de agarosa 0,7%) a 37°C . Cincuenta mL de la mezcla se pipetea en portaobjetos de vidrio recubiertos previamente con 0,65% de agarosa, precubierto con una hoja de cubierta (24 x 60 mm), y se deja solidificar a 4°C durante 5 minutos. Los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente a continuación, a partir de los portaobjetos de vidrio. La prueba de SCD se realizó siguiendo el procedimiento de Fernández et al., Con modificaciones menores. [5] Después de retirar las cubiertas, las laminillas fueron inmediatamente sumergidos horizontalmente en una bandeja con ácido recién preparada con solución de desnaturalización (HCl 0,08 N) durante 7 minutos a 22°C en la oscuridad para generar (ssDNA) motivos de ADN de cadena sencilla restringidas de ADN descansos. A continuación, el proceso de desnaturalización se detuvo y las proteínas se eliminaron por transferencia de los portaobjetos a una bandeja con neutralizante y solución de lisis (0,4 M de Tris, 0,4 M de 1,4-ditiotreitol [TDT], 1% de Triton X-100, y 50 mM de ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], pH 7,5)

durante 15 minutos a 22 ° C, seguido de lavado en tampón de Tris-borato-EDTA (0,09 M de Tris borato y 0,002 M de EDTA, pH 7,5) durante 2 minutos. Después las muestras se deshidrataron en baños de etanol secuencial 70%, 90%, y 100% (2 minutos cada uno) y se secó al aire. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con el reactivo de Diff-Quik para microscopía óptica de campo. [6]

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros del semen, porcentaje SDF y los días de abstinencia sexual se analizaron para la normalidad de la distribución y de la igualdad de la varianza. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student y el análisis de la varianza (ANOVA). La Correlación estadística se realizó mediante la prueba de una cola *r* de Pearson. El nivel de significación fue <0,05. El análisis estadístico se realizó con SPSS v.20.0.

RESULTADOS

Los resultados mostraron que la abstinencia sexual en el grupo de estudio fue $3,63 \pm 2,92$ días y el porcentaje SDF media fue de $28,75 \pm 14,16$. La muestra se dividió en dos grupos: pacientes con leucocitospermia ($n = 86$) y sin ($n = 66$). (Tabla 1 y Figura 1) análisis de los datos *r* de Pearson reveló una débil correlación positiva ($r = 0,208$) estadísticamente significativa ($p = 0,027$) entre la duración de la abstinencia sexual y el porcentaje de fragmentación de ADN del esperma en pacientes con leucocitospermia. En los pacientes sin leucocitospermia, hubo una débil influencia negativa ($r = -.043$) de la duración de la abstinencia sexual sobre la SDF, que no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$), pero el análisis de la prueba t de Student, aunque tampoco fue significativa mostró una tendencia que podría desaparecer al aumentar el número de pacientes (Tabla 2 y Figura 2).

DISCUSIÓN

Estudios previos han evaluado el efecto de la abstinencia sexual en los parámetros seminales. De Jonge et al., evaluó la influencia de determinados períodos de abstinencia eyaculatoria en los parámetros seminales en un mismo sujeto. Encontraron que la abstinencia no influyó en el porcentaje de SDF, en muestras de hasta 8 días de abstinencia, pero a diferencia de nosotros, no individualizaron las muestras en cuanto a la presencia o ausencia de leucocitospermia. [7] Por el contrario, otro estudio realizado por Richthoff et al., Reportó una correlación positiva entre el índice de fragmentación del ADN y el tiempo de abstinencia en un estudio entre sujetos. [8] Nuestros resultados confirmaron que existe una relación positiva entre la cantidad de días de abstinencia sexual y el porcentaje de SDF, pero sólo en pacientes con leucocitospermia. La inflamación ha sido recientemente relacionada con leucocitospermia, especialmente en relación con la cantidad de interleucina 8 soluble en el esperma. [9] La reacción inflamatoria, aguda o crónica, en el tracto genital masculino puede dar lugar a estrés oxidativo por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que es más acentuada en el caso de infecciones crónicas. Dado que el conteo de espermatozoides y la calidad es el resultado de un proceso que se inició por lo menos tres meses antes, la presencia de un mayor número de leucocitos en el semen representa una inflamación crónica. Los leucocitos pueden liberar ROS o pueden estimular su producción en los espermatozoides. [10], y por consiguiente puede dañar directamente el ADN de esperma o inducir una respuesta tipo apoptótica que resulta en la fragmentación del ADN. [11] Un aumento de seminal de ROS por 25% se ha asociado con un aumento del 10% en la fragmentación de ADN de esperma. [12] Nuestros resultados mostraron un aumento del 3% en la fragmentación del ADN en las muestras con leucocitospermia, pero es claro que existen numerosas causas de la fragmentación del ADN [1] que necesitan ser evaluados en este grupo en particular.

En conclusión nuestros resultados mostraron que en presencia de leucocitospermia el intervalo de abstinencia sexual resulta en un aumento de la fragmentación del ADN.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Atken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000;21:33-44.
- 2 Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Elia MF, Natali I, Cambi M, Forti G, Baldi E, Muratori M. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian Journal of Andrology.* 2012;14:24-31.
- 3 Aitken RJ, De Luliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum, Reprod.* 2010;25:2415-2426.
- 4 World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO Press, World Health Organization; 2010.
- 5 Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálves J, Enciso M. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J androl.* 2003;24:59-66.
- 6 Zhang Lh, Qiu Y, Wang Kh, Wang Q, Tao G, Wang Lg. Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick- end labeling assay. *Fertility and Sterility.* 2010 August;3:1027-1032.
- 7 De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertility and Sterility.* 2004;82:58-65.
- 8 Richthoff J, Spano M, Giwercman YL, Frohm B, Jepson K, Malm J. The impact of testicular and accessory sex gland function on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Hum Reprod.* 2002;17:3162-9.
- 9 Lotti F, Maggi M. Interleukin 8 and the male genital tract. *J Reprod Immunol.* 2013;100(1):54-65.
- 10 Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertility and Sterility.* 2008;90:328-34.
- 11 Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJJ. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod.* 2004;19:129-38.
- 12 Mahfouz R, Sharma R, Thiyagarajan A, Kale V, Gupta S, Sabanegh E, Agarwal A. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertility and Sterility.* 2010;94:2141-6.

ANEXOS

Tablas

Tabla I. Media (desviación estándar) de todas las variables consideradas en pacientes con y sin leucocitospermia.

Características	Con Leucocitospermia (n = 86)	Sin Leucocitospermia (n = 66)	Valor P^a
Edad, media (SD), años	38.62(5.67)	39.1(5.67)	.911
Parámetros seminales			
SDF, media (SD), %	27.78(12.19)	30.35(16.41)	.022
Abstinencia, media (SD), días	3.90(3.79)	3.27(.953)	.057
Volumen, media (SD), mL	2.79(1.32)	2.29(1.57)	.217
Concentración, media (SD), Sperm/mL x10 ⁶	113.04(75.22)	82.37(76.92)	.002
Motilidad, media (SD), %	42.95(15.00)	47.89(18.29)	.038
Morfología, media (SD), %	17.06(9.65)	17.14(11.77)	.031
Viabilidad, media (SD), %	79.79(81.51)	64.11(116.579)	.434
pH	7.95(.30)	7.98(.29)	.080

^aValor P para leucocitospermia vs sin leucocitospermia (prueba t para igualdad de medias)

Nota: SD = Desviación estándar

Tabla II. Correlación bivariada entre la SDF y la abstinencia en pacientes con y sin leucocitospermia (Coeficiente de correlación de Pearson)

Variable	Abstinencia con leucocitospermia	SDF sin leucocitospermia	Valor P
SDF con leucocitospermia	0.203 ^a		.031 ^a
Abstinencia sin leucocitospermia		-.043	.366

^aLa correlación es significativa a un nivel de 0.05 (1-cola)

Figuras:

Figura1: Diagrama de dispersión de puntos de la SDF y abstinencia de 66 pacientes sin leucocitospermia

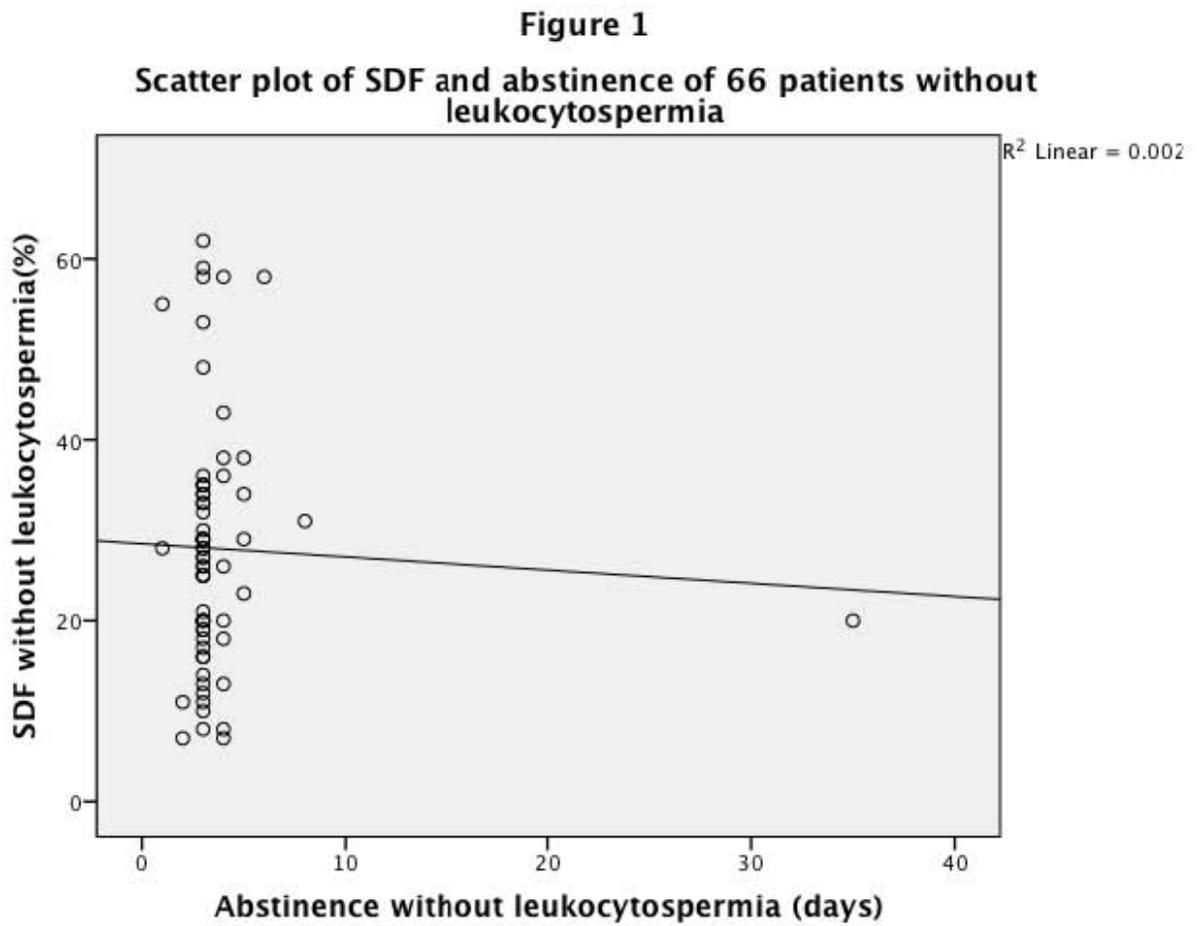


Figura 2: Diagrama de dispersión de puntos de la SDF y abstinencia de 86 pacientes con leucocitopenia

