



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO

**EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DEL
ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN ESPERMÁTICA DE
ADN EN LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER
EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA
PRESENTA

DRA. JENNIFER SEDGLACH ROCHA.

DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. PEDRO CUAPIO PADILLA.

ASESOR DE TESIS:
DR. SERGIO TÉLLEZ VELASCO.

MÉXICO D.F, JULIO DE 2014



HOSPITAL ESPAÑOL



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

Quiero agradecer en estas líneas mi más sincero agradecimiento a todas aquéllas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Biol. y M.Cs. Pedro Cuapio Padilla, director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido en estos dos años.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas del profesor y amigo Dr. Sergio Téllez Velasco, con la que me encuentro en deuda por el ánimo difundido y la confianza depositada en mí.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros de la Clínica de Reproducción Asistida Hisparep, Hospital Español de México por su amistad y colaboración.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A todos ellos, muchas gracias.

DEDICATORIA

A mis padres por su amor, apoyo incondicional, motivación y sacrificios en todos estos años, gracias a ustedes he podido llegar hasta aquí.

A tu paciencia, apoyo, amor y comprensión, gracias por siempre estar siempre a mi lado Víctor.

A mis amigos y compañeros, con los que compartí este camino.

A mis queridos maestros, quienes compartieron sus conocimientos, experiencia, profesionalismo y humanismo:

Dr. Gerardo Velázquez Cornejo.

Dr. Carlos Gerardo Salazar López Ortiz.

Dr. Héctor Luis Mondragón Alcocer.

Dr. José Luis Castro López.

Dr. Sergio Téllez Velasco.

Biol. Juan José Luna Martín del Campo.

Biol. Hugo Manuel Rodríguez Hernández.

M. en C. Pedro Cuapio Padilla.

Finalmente, a mis pacientes, quienes depositaron su confianza y me permitieron avanzar en mi formación.

ÍNDICE

I. Lista de abreviaturas	6
II. Resumen	8
III. Marco teórico	9
1. Sistema reproductor masculino.....	9
1.1. Testículos.....	9
1.2. Vías .espermáticas.....	9
1.3. Glándulas sexuales anexas.....	12
1.4. Pene.....	12
1.5. Uretra masculina.....	13
2.Esteroidogénesis.....	14
3. Espermatogénesis.....	15
3.1 Espermatozoide.....	17
3.2.....	
Semen.....	18
4. Regulación hormonal.....	19
5. Infertilidad masculina.....	21
6. Evaluación del varón infértil.....	23
7. Reproducción humana.....	28
8. Desarrollo embrionario.....	30
9.Técnicas de reproducción asistida (TRA).....	32
10. Características del ADN.....	36
10.1 Fragmentación del ADN.....	37
10.2. Mecanismos de fragmentación del ADN.....	38
10.3. Técnicas de estudio de la fragmentación del ADN espermático..	42
10.4. Prueba de dispersión de la cromatina del espermatozoide (SCD o Sperm Chromatin Dispersion).....	44
IV. Planteamiento del problema	47
V. Hipótesis	48
VI. Objetivos de la investigación	49
VII. Material y Métodos	50
VIII. Resultados	58
IX. Discusión	63
X. Conclusiones	66
XI. Referencias bibliográficas	67

LISTA DE ABREVIATURAS.

ABP: proteína fijadora de andrógenos.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

βhCG: fracción beta de hormona gonadotrópica humana.

CBAVD: ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes.

DBD-FISH: DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (Detección de la rotura de ADN por Hibridación in situ con fluorescencia).

DFI: Índice de fragmentación del DNA.

DHT: Dihidrotestosterona.

EOC: Estimulación ovárica controlada.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

FIV: Fecundación *in vitro*.

FIV-TE: Fecundación *in vitro* con Transferencia de Embriones.

FSH: Hormona estimulante de folículos.

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas.

hCG: Hormona gonadotropina coriónica.

IAE: Inseminación artificial con semen de esposo.

ICSI: Inyección intracitoplasmática del espermatozoide.

IIU: Inseminación intrauterina.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LH: Hormona luteinizante

MII: Metafase II.

OD: Óvulos de donante.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PN: Pronúcleo.

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

SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay (Ensayo de la estructura de la cromatina del espermatozoide).

SHO: Síndrome de hiperestimulación ovárica.

SNC: Sistema nervioso central.

TRA: Técnicas de reproducción asistida.

TSH: Hormona estimulante de la tiroides.

TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labeling (Marcación de extremos rotos de ADN por transferasa terminal y dUTP).

II. RESUMEN

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

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

Por lo anterior, en el presente estudio se analizó a las parejas que acudieron a la Clínica de Reproducción Asistida, Hisparep por infertilidad y que por indicación médica se le realizó al varón un análisis seminal con Índice de Fragmentación de ADN espermático (DFI) utilizando la Prueba de Dispersión de la Cromatina del espermatozoide y, se evaluó su capacidad de fertilización en técnicas de reproducción asistida.

Los resultados obtenidos en este estudio muestra una correlación con la movilidad, la anormalidad y la cabeza con el DFI espermático. También se pudo observar que cuando se utilizan óvulos de pacientes u óvulos de donantes tanto en FIV como en ICSI existe una correlación positiva entre la fragmentación del ADN espermático y los resultados de las técnicas de reproducción asistida como es la fecundación, el desarrollo embrionario y la tasa de embarazo.

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

III. MARCO TEÓRICO

1. SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO

La reproducción en el varón depende de la interacción de señales hormonales y nerviosas entre el sistema nervioso central, el hipotálamo, la hipófisis y el testículo.

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

1.1. Testículos

Los testículos son órganos situados en el exterior de la cavidad abdominal, para mantener una temperatura ligeramente inferior (0.5°C) (Córdova, 2003). Miden de 4 a 5 cm de diámetro, 3 cm de ancho y un espesor de 2,5 cm, pesan alrededor de 20 g y tienen un volumen aproximado de 30 ml. La función principal del testículo es la producción de espermatozoides (espermatogénesis) y la síntesis de hormonas sexuales masculinas (esteroidogénesis). La espermatogénesis se lleva a cabo en los túbulos seminíferos, mientras que la esteroidogénesis en las células de Leydig en el intersticio (Wein, 2008, Moore, 2013).

Los testículos están rodeados por la cápsula testicular compuesta de tres capas: túnica vaginal, túnica albugínea y túnica vasculosa, lo que le confiere su consistencia dura, las cuales en conjunto son capaces de producir contracciones periódicas (Stevens, 2006).

1.2. Vías espermáticas

La túnica albugínea se proyecta al interior del testículo para formar tabiques conjuntivos que se dividen en aproximadamente 250 compartimientos piramidales

conocidos como lobulillos testiculares, cada uno de éstos contiene de uno a cuatro túbulos seminíferos en cuyas paredes se producen los espermatozoides a partir de células germinales primitivas (espermatogénesis) y un estroma de tejido conjuntivo en la que hay células intersticiales de Leydig (Stevens, 2006; Nieschlag, 2010).

Cada túbulo seminífero tiene una longitud que van de 30 a 70 cm y un diámetro de entre 150 y 250 μm y está revestido por epitelio germinativo o seminífero complejo, que es un epitelio cúbico estratificado complejo y está cubierto por tejido fibroso, el cual a su vez, está compuesto por células mioideas y fibrillas de colágeno que producen contracciones rítmicas para la movilización de los espermatozoides. Por fuera de este tejido fibroso, en el tejido intersticial hay vasos sanguíneos y linfáticos (Stevens, 2006).

El epitelio seminífero está compuesto por dos poblaciones celulares básicas, las células de Sertoli y las espermatogonias. Las células de Sertoli son células con prolongaciones apicales que se fusionan por medio de uniones herméticas, lo que le permite rodear a las células espermatogonias contiguas y ocupar los espacios entre éstas. Las células de Sertoli sintetizan transferrina, inhibina, proteína fijadora de andrógenos (ABP) y factores de crecimiento y permanecen en contacto con las células germinales para que estas puedan sobrevivir (Stevens, 2006; Nieschlag, 2010).

En el tejido intersticial, se hallan las células intersticiales de Leydig, éstas células poliédricas grandes que de manera característica contienen inclusiones lipídicas, se diferencian y secretan testosterona desde las primeras etapas de la vida fetal, la cual es necesaria durante el desarrollo embrionario, en la maduración sexual y en la función reproductora (Stevens, 2006, Nieschlag, 2010).

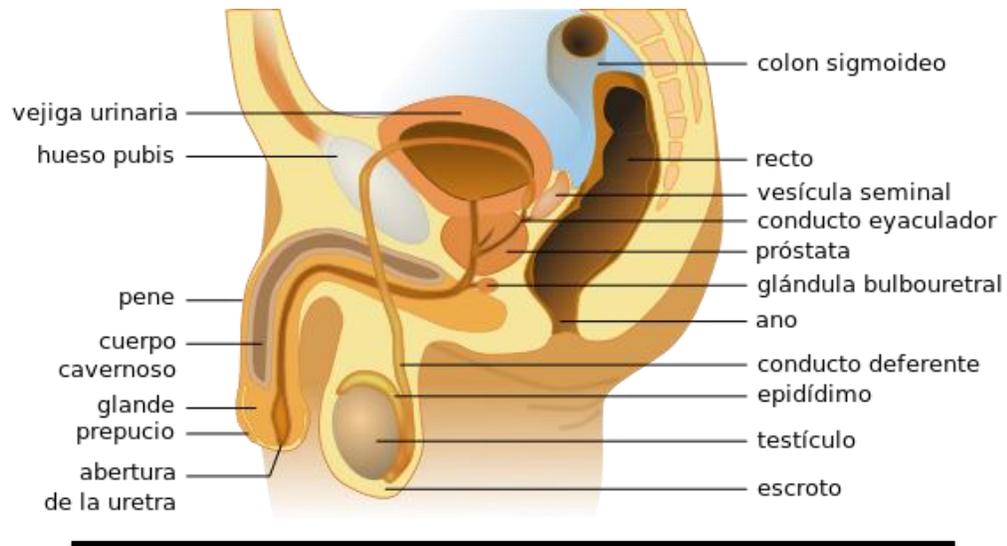


Figura 1. Aparato reproductor masculino
(Tomado y modificado de Tsaitgaist, 2009)

Este sistema de conductos está formado por el epidídimo, el conducto deferente y el conducto eyaculador. La red testicular está unida al epidídimo por los conductos deferentes. El epidídimo es una estructura que se encuentra en la parte superior y posterior del testículo y mide aproximadamente 7.5 cm de longitud y se divide en tres segmentos: cabeza, cuerpo y cola; la cabeza y el cuerpo intervienen en el proceso de maduración del espermatozoide, mientras que la cola sirve de almacén para los espermatozoides maduros hasta el eyaculado. A partir de ese punto, los espermatozoides pasan hacia el conducto deferente (Wein, 2008; Stevens, 2006; Nieschlag, 2010).

El conducto deferente tiene una consistencia dura y mide aproximadamente 40 cm de longitud, en su porción terminal se forma una ampolla que sirve de almacén de espermatozoides. Esta ampolla se une al conducto de la vesícula seminal y forma al conducto eyaculador que continúa hasta la uretra a través de la próstata. El conducto eyaculador es un segmento terminal corto en cada conducto genital (Córdova, 2003; Stevens, 2006; Nieschlag, 2010).

1.3. Glándulas sexuales anexas

Las vesículas seminales son dos glándulas alargadas y muy tortuosas localizadas a cada lado de la próstata. Por acción de la testosterona secretan un líquido amarillento alcalino y viscoso que compone el líquido seminal. La contracción de la cubierta muscular lisa de las vesículas seminales durante la eyaculación expulsa su secreción hacia el extremo prostático de la ampolla, y el contenido de la ampolla así como el de la vesícula seminal pasan a los conductos eyaculadores que atraviesan el cuerpo de la glándula prostática y contribuye a evacuar los espermatozoides de la uretra (Córdova, 2003; Nieschlag, 2010).

La próstata es un órgano dependiente de andrógenos que rodea a la uretra y contiene entre 30 y 50 glándulas túbulo-alveolares cuyos conductos desembocan en la uretra prostática; la secreción prostática es un líquido lechoso con un pH aproximado de 6.5. Durante la emisión, la cápsula de la glándula prostática se contrae simultáneamente con el conducto deferente, de forma que el líquido poco denso, lechoso, de la glándula prostática contribuye aún más al volumen del semen (Córdova, 2003; Stevens, 2006).

Las glándulas bulbouretrales o de Cowper, son órganos pares, de 0.5 cm de diámetro, y están por detrás de la uretra, secreta un líquido mucoso, alcalino con galactosa, galactosamina, ácido galacturónico, ácido siálico y metilpentosa. Durante la estimulación sexual se libera la secreción (líquido preseminal y lubrica la uretra esponjosa antes de que llegue el eyaculado (Stevens, 2006).

1.4. Pene

Y finalmente el pene, es un órgano eréctil muy vascularizado, que permite el depósito de los espermatozoides en el conducto vaginal femenino. Este órgano consiste principalmente de dos masas dorsales de tejido eréctil llamados cuerpos cavernosos y una masa ventral del mismo tejido llamada cuerpo esponjoso en el que está incluido el segmento esponjoso de la uretra. Los cuerpos cavernosos

contienen abundantes espacios vasculares que aumentan de tamaño y adquieren mayor rigidez al llenarse de sangre que proviene sobre todo de las arterias helicinales. Estas arterias se dilatan durante la erección para aumentar el flujo sanguíneo al pene (Wein, 2008; Moore, 2013).

El pene tiene una doble función. Al contener en su interior parte de la uretra, interviene en la micción. Por otra parte, es el órgano copulador en el acto sexual. Por estimulación parasimpática, los cuerpos cavernosos y esponjoso se llenan de sangre, con lo cual, el pene aumenta de tamaño, se endurece y se pone rígido durante la erección, necesaria para la realización del coito. En este proceso intervienen varios factores; en primer lugar, la dilatación de las arterias produce el llenado de los cuerpos cavernosos y esponjoso; por otra parte, la musculatura de la raíz del pene, músculos isquiocavernosos y bulbocavernoso, se contrae, impulsando aún más la sangre hacia el pene; el músculo transverso profundo del perineo, diafragma urogenital, se contrae, dificultando la salida de sangre ya que comprime las venas que pasan a través de él. Por último, las contracciones del músculo bulbocavernoso impulsan el semen en la eyaculación a través de la uretra peneana (Córdova, 2003).

1.5. Uretra masculina

Desde la vejiga urinaria, la uretra desciende verticalmente, atravesando la próstata desde su base hasta el vértice: es la uretra prostática. En este tramo presenta un relieve en su pared posterior, el veru montanum, donde desembocan los dos conductos eyaculadores y, entre ellos, el utrículo prostático, que es un pequeño divertículo de aproximadamente 1 cm de longitud. A ambos lados del veru montanum desembocan las glándulas prostáticas; hay unos 20 o 30 orificios correspondientes a estos conductos de desembocadura. La uretra prostática tiene una longitud de unos 3 cm (Córdova, 2003; Wein, 2008; Moore, 2013).

2. ESTEROIDOGÉNESIS

El término de esteroidogénesis se refiere a las reacciones enzimáticas que conduce a la producción de hormonas esteroideas masculinas (Nieschlag, 2010).

Las células de Leydig fueron descritas por primera vez en 1850 por Franz Leydig (1821-1908) y se encuentran en el compartimento intersticial. Sintetizan y liberan testosterona, dihidrotestosterona y androstenediona. La testosterona es el principal andrógeno testicular, el 95% está presente en el plasma de varones y es sintetizada en los testículos. Aunque estas células pueden sintetizar colesterol a partir de acetil-CoA, lo obtienen fundamentalmente del plasma, a partir de los ésteres de colesterol que forman parte de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL se introducen a la célula por endocitosis mediada por receptor; los ésteres de colesterol pueden almacenarse en gotas de lípidos o convertirse en colesterol libre para ser utilizado en la síntesis de las hormonas esteroides. La transformación del colesterol en pregnenolona, es el paso limitante en la biosíntesis de testosterona y se realiza en la mitocondria, por lo que el colesterol debe ser transportado e internalizado en la mitocondria. La pregnenolona es liberada de la mitocondria y pasa al retículo endoplásmico liso, donde se completa la esteroidogénesis. Dos rutas metabólicas conducen a la síntesis de testosterona en el testículo, una a partir de 17-hidroxi-pregnenolona, conocida como la ruta $\Delta 5$, y otra a partir de 17-hidroxiprogesterona o $\Delta 4$; los esteroides intermediarios de la ruta $\Delta 5$ pueden convertirse en el $\Delta 4$ correspondiente (Wein, 2008; Nieschlag, 2010).

La testosterona puede seguir dos rutas metabólicas y transformarse en otros esteroides biológicamente activos. Por la ruta de la 5α reductasa se transforma primero en dihidrotestosterona (DHT) y a continuación en 3α diol y por la ruta de la aromatasa, la testosterona se transforma en estradiol y la androstenediona en estrona (Wein, 2008; Nieschlag, 2010).

3. ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis tiene lugar en compartimiento tubular. Comienza con la división de las células madre y termina con la formación de espermatozoides maduros. Ocurre en los túbulos seminíferos durante la vida sexual activa, como consecuencia del estímulo producido por las hormonas gonadotrópicas de la hipófisis anterior (Málaga y col., 2005, Nieshlag, 2010) **(Figura 2)**.

Todo el proceso de la espermatogénesis se puede dividir en cuatro fases:

1. Proliferación mitótica y la diferenciación de las células germinales diploides (espermatogonias) (espermatogoniogénesis)
2. División meiótica de células germinales tetraploides (espermatocitos) que resulta en células germinales haploides (espermátides).
3. Transformación de espermátides en esperma testicular (espermatogénesis).
4. Liberación de esperma del epitelio germinal en la luz tubular (espermiación) (Nieschlag, 2010).

Durante la primera etapa de la espermatogénesis las espermatogonias primitivas, localizadas junto a la membrana basal del epitelio llamadas espermatogonias tipo A, se dividen y originan células un poco más diferenciadas (se pueden distinguir con una citología), y desde un punto fisiológico en Ad (oscuro) y el Ap (pálido). Las espermatogonias Ad no muestran actividad proliferativa en circunstancias normales y sólo se dividen en raras ocasiones (Ehmcke y Schlatt, 2006).

En el compartimiento luminal, después de varias divisiones adicionales estas células se convierten en espermatocitos primarios (número diploide de cromosomas), los que se a su vez mediante la primera división meiótica se dividen para formar dos espermatocitos secundarios (número haploide, uno con el cromosoma sexual X y otro con el Y) y mediante una segunda división meiótica los espermatocitos secundarios generan cuatro espermátides (Málaga y col., 2005,

Nieshlag, 2010; Speroff, 2012).

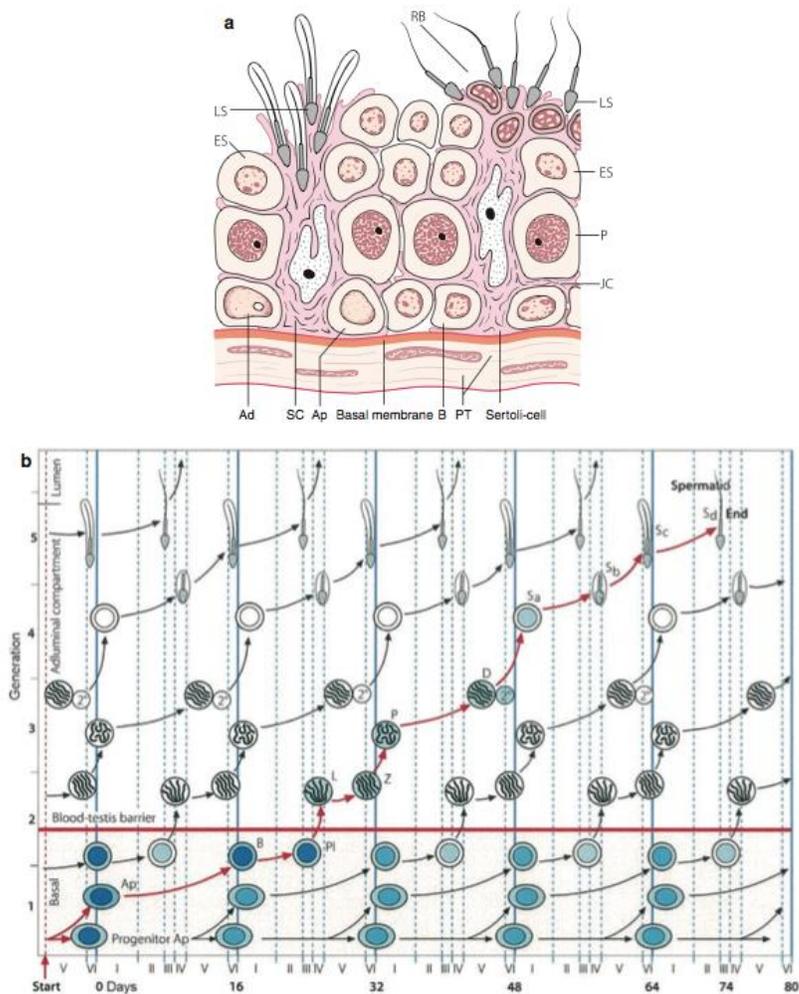


Figura 2. **a)** Representación esquemática del epitelio del túbulo seminífero, células peritubéricas (PT), y lámina basal (BL). RB cuerpo residuales, LS espermátides elongadas tardíamente, ES espermátides tempranas, P espermatocitos, Ad espermatogonia oscura, Ap espermatogonia clara, B espermatogonia tipo B, SC células de Sertoli, JC complejo de unión.

b) cinética del epitelio del túbulo seminífero, descendientes de una célula rogenitora. PI espermatocito en preleptoteno, Z espermatocito en zigoteno, D espermatocito en diploteno (Tomado y modificado de Nieshlag, 2010)

Finalmente cada espermátide cambia gradualmente hasta convertirse en un espermatozoide maduro, por medio de la pérdida de citoplasma, reorganización del material cromatínico del núcleo, formación de una cabeza compacta,

acumulación del citoplasma residual y de la membrana celular en un extremo de la célula para formar la cola. Esta serie de cambios morfológicos se le conoce como espermiogénesis. El proceso completo de la espermatogénesis hasta la espermiogénesis dura aproximadamente 70 días (Nieshlag, 2010; Speroff, 2012) **(Figura 3).**

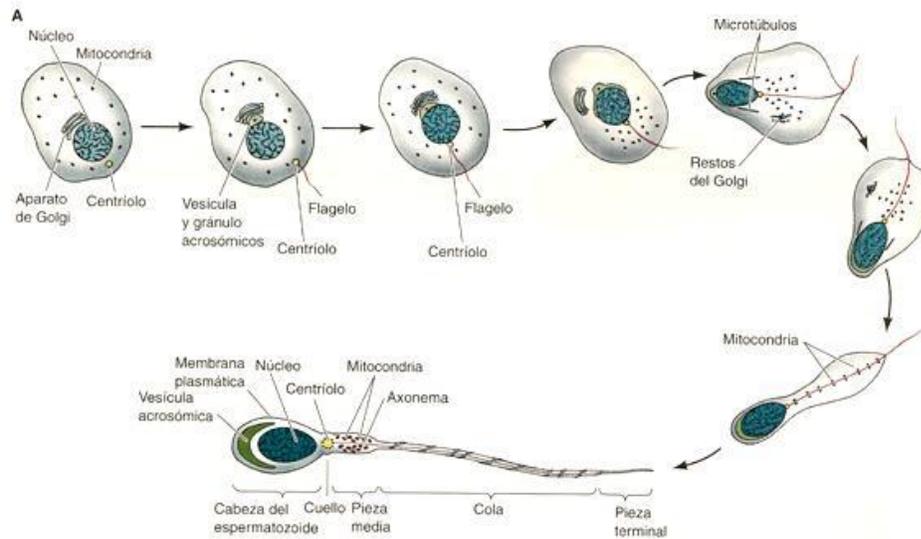


Figura 3. Espermiogénesis (Tomado de Gilbert, 2005).

3.1. Espermatozoide.

El espermatozoide maduro tiene unos 60 μm de longitud, incluye cabeza, pieza intermedia y cola (Málaga y col., 2005) **(Figura 4).**

En la cabeza del espermatozoide se encuentra el núcleo que contiene el ADN condensado y el acrosoma denso en su margen anterior. Su cabeza mide 4.5 μm de largo por 3 μm de ancho por 1 μm de espesor. El casquete acrosómico es una cobertura de la cabeza, a manera de gorra que cubre los dos tercios anteriores del núcleo; es un organelo similar a un lisosoma, rico en hialuronidasa, neuraminidasa, fosfatasa ácida y una proteasa similar a la tripsina llamada acrosina. El primer paso

de la reacción acrosómica es la liberación de estas enzimas, cuando el espermatozoide entra en contacto con el óvulo estas enzimas facilitan la penetración del espermatozoide a la membrana pelúcida y la posterior fecundación, y a su vez impide la entrada de otros espermatozoides en el óvulo. La cola del espermatozoide está subdividida después del cuello en pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. El cuello contiene los centriolos y el origen de las fibras gruesas. La pieza intermedia es de alrededor de 7 μm de longitud y contiene las mitocondrias dispuestas en forma helicoidal alrededor de las fibras gruesas y del complejo axonémico. Estas mitocondrias proveen la energía para el movimiento de la cola y por ende son la causa de la movilidad del espermatozoide. La pieza principal mide alrededor de 40 μm de longitud y contiene la vaina fibrosa por fuera de las fibras gruesas y del complejo axonémico. La pieza terminal, que corresponde aproximadamente a los últimos 5 μm del flagelo en el espermatozoide maduro, sólo contiene el complejo axonémico (Stevens, 2006; Ross y Pawlina, 2004).

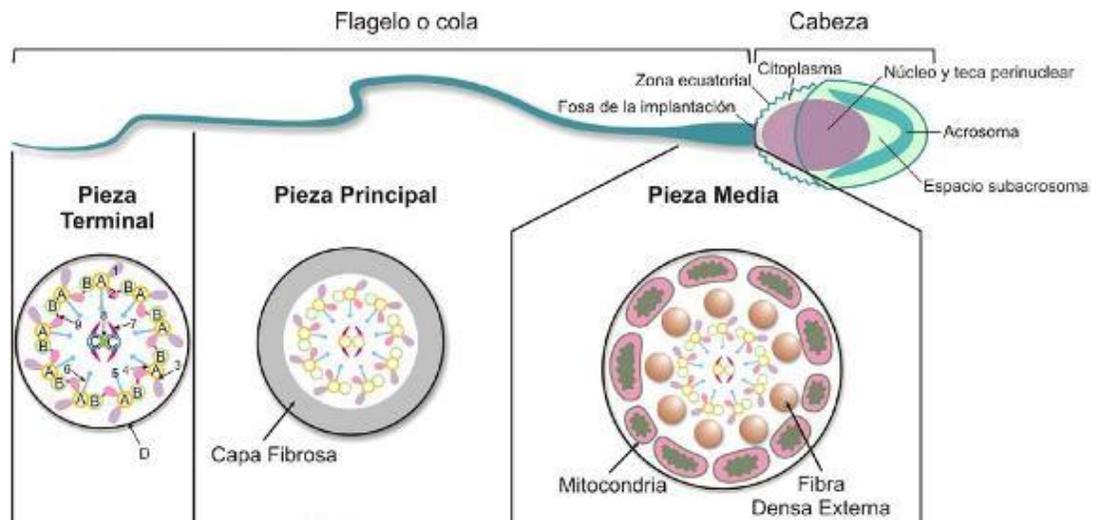


Figura 4. Espermatozoide humano
(Tomado y modificado de Olivera y colbs., 2006).

3.2. Semen

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

El líquido seminal está compuesto de:

- a) Lípidos: colesterol, glicerofosforilcolina.
- b) Glúcidos: glucosa, fructosa.
- c) Ácidos orgánicos: ácido cítrico, ácido ascórbico.
- d) Minerales: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} .
- e) Proteínas: albúmina, α globulina, β globulina, γ globulina.
- f) Constituyentes de pequeña masa molecular: aminoácidos, carnitina, espermina, glutatión.
- g) Esteroides: testosterona; deshidroepiandrosterona.
- h) Prostaglandinas
- i) Enzimas: hidrolasas, deshidrogenasas, etc. (Poirot y Cherruau, 2005).

4. REGULACIÓN HORMONAL

La función testicular normal requiere las acciones de las dos gonadotropinas hipofisarias, la folitropina (FSH) y la lutropina (LH). Son glucopéptidos producidos por las células gonadotrópicas de la hipófisis anterior y secretadas con un patrón pulsátil. La LH se une a receptores de membrana específicos y de alta afinidad en las células de Leydig. La unión estimula la síntesis y liberación de testosterona

(esteroidogénesis), mientras que la FSH se une a receptores de las células de Sertoli y estimula la síntesis de un gran número de proteínas específicas, tales como la proteína fijadora de andrógenos (ABP), inhibina, activina, etc. La FSH estimula la aromatización de la testosterona a estradiol en las células de Leydig y estimula la espermatogénesis. La estimulación gonadotrópica provoca la liberación de estas hormonas a la vena espermática (Nieshlag, 2010; Speroff, 2012) **(Figura 5)**.

A su vez, la secreción de LH y FSH por la hipófisis está controlada por la testosterona y sus productos metabólicos mediante mecanismos de retroalimentación negativa. La testosterona actúa principalmente sobre el hipotálamo para regular la secreción de GnRH, reduciendo de este modo la frecuencia de los pulsos de liberación de LH. La inhibina y la activina son glucoproteínas que participan en la regulación de la secreción de FSH. La inhibina B, producida por las células de Sertoli, entra en la circulación periférica e inhibe la secreción hipofisiaria de FSH. La activina estimula la secreción de FSH (Figura 5). Con estos circuitos de retroalimentación endocrina, la función testicular en general y la secreción de testosterona en concreto se mantienen en un nivel relativamente estable (Lavin, 2003; Speroff 2012).

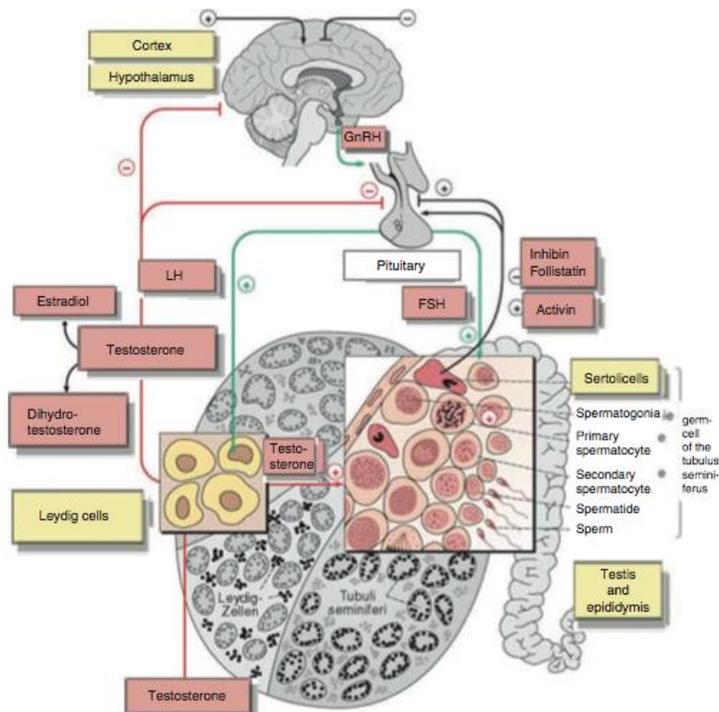


Figura 5. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo
(Tomado y modificado de Nieschlag, 2010).

5. INFERTILIDAD MASCULINA

La infertilidad se define como la incapacidad de lograr un embarazo tras un año de mantener relaciones sexuales regulares sin protección anticonceptiva (Pérez, 2011).

El factor masculino es responsable del 30 ó 40% de los casos. En aproximadamente 30% de estas parejas la infertilidad se debe al factor masculino y en 20% a una combinación de los factores masculino y femenino, por lo que el factor masculino esta involucrado en alrededor del 50% de las parejas infértiles. La infertilidad se considera primaria cuando la pareja logra fecundación natural pero los embriones no se desarrollan y no llegan a término, mientras que la infertilidad secundaria es cuando la pareja ya tuvo hijos y posteriormente, por

alguna razón, presentan problemas para embarazarse (Dohle y col., 2010; García y col., 2010).

Causas de infertilidad:

Afecciones endócrinas.

Una alteración en la hipófisis o hipotálamo puede dar lugar a un hipogonadismo hipogonagotrópico, pudiendo ser congénita con una deficiencia en la producción de GnRH, o secundaria a la aparición de adenomas hipofisarios (prolactinomas, craneofaringiomas, otros tumores cerebrales, radioterapia). Pudiendo originar disminución de la libido, infertilidad, anemia, alteraciones de la distribución del vello corporal y disminución de la masa muscular magra y de la densidad ósea (García y col., 2010; Masson y col., 2014).

Infecciones genitourinarias

Causa frecuente de infertilidad por los siguientes agentes: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *U. urealyticum*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. viridans*, *Enterococcus*, *M. tuberculosis* y orquitis virales. Pudiendo ocasionar atrofia testicular, compromiso de las glándulas accesorias u obstrucciones de las vías seminales, además de producción de anticuerpos antiespermatozoides e incrementos de los niveles de leucocitos seminales y radicales libres. Puede revertir la fertilidad si la infección es tratada y dependerá de la cronicidad (Teppa y Palacios, 2004).

Varicocele

Es la dilatación varicosa de las venas espermáticas y el plexo pampiniforme por incompetencia valvular venosa con aumento de la presión intravascular con un reflujo retrógrado espermático. La fisiopatología del varicocele inciden en diversas circunstancias: temperatura, metabolitos tóxicos, factores enzimáticos y hormonales, hipoxia, alteraciones epididimarias e hipertensión. Ocasionando cambios ultraestructurales en las células de Sertoli, maduración incompleta de

espermátides y espermatoцитos, engrosamiento tubular con disminución del diámetro y fibrosis de los túbulos, alteración en las células de Leydig y alteraciones en el testículo contralateral (Briceño y col., 2008; Masson y col., 2014).

Alteraciones genéticas

Las causas genéticas más frecuentes son el síndrome de Klinefelter, anomalías cromosómicas estructurales y numéricas, así como microdeleciones del cromosoma Y. Esto puede provocar una producción espermática anormal, desórdenes en la espermatogénesis u obstrucción del sistema ductal. La patología de la reproducción masculina mediada genéticamente puede causar el fracaso reproductivo pretesticular, testicular o posttesticular (Schlosser y col., 2007)

Factores inmunológicos

Afectaciones como la criptorquidia, la epididimitis o los traumatismos genitales pueden ocasionar anticuerpos antiespermatozoides, haciendo que se adhieran a los espermatozoides en el plasma seminal, disminuyendo la penetración en el moco cervical, inhibiendo la capacitación y reacción acrosómica prematura. (Schlosser y col., 2007; Briceño y col., 2008).

Disfunción en la eyaculación.

Puede ser de origen traumático, iatrogénico, farmacológico, metabólico o psicológico, impidiendo la inseminación vaginal (Schlosser y col., 2007; García y col., 2010)

Si no se encuentra la causa, podemos hablar de una infertilidad idiopática o inexplicable.

6. EVALUACIÓN DEL VARÓN INFÉRIL

La evaluación inicial consiste en 3 aspectos: interrogatorio clínico, examen físico y espermatozoides directa, como se desglosa a continuación:

Interrogatorio clínico.

Debe ser lo más completo y detallado posible. Algunos de los aspectos más importantes son: frecuencia coital, duración de la infertilidad, así como fertilidad pasada y episodios de infecciones de transmisión sexual. Enfermedades de la infancia y su evolución. Enfermedades sistémicas, su evolución y tratamiento, cirugías, enfermedades de transmisión sexual, sus tratamientos, evolución y complicaciones. Exposición a gonadotóxicos o calor. Exposición a fármacos con potencial efecto sobre las gónadas: Antidepresivos tricíclicos, antihipertensivos, terapia antirreumática (sulfazalazina), enfermedad ácido péptica (cimetidina), nitrofurantoína; cirugía pélvica; enfermedades crónicas degenerativas (diabetes mellitus, esclerosis múltiple); enfermedades respiratorias crónicas. (Oehninger y col., 2007; Lineamientos en infertilidad, 2011)

Examen físico

Posición de bipedestación para lograr la correcta valoración del pene tanto en tamaño, situación del meato urinario externo; así como hipo y epispadias. Los testículos deberán ser valorados con el orquidómetro de Pader, considerándose valores normales de 4.5 cm de longitud y 2.5 cm de anchura y con un volumen de 15 ml. Es importante también la palpación y consistencia de los conductos deferentes y el epidídimo; también la visualización y palpación de dilataciones venosas en el plexo pampiniforme (varicocele) al reposo y durante la maniobra de Valsalva (Lineamientos en infertilidad, 2011).

Espermatobioscopía directa

Sigue siendo la piedra angular. Se deben realizar al menos 2 seminogramas (separados como mínimo 1 mes), analizándose de acuerdo a la descripción de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2010 y actualizada por las Guías de la Asociación Europea de Urología de 2010. El examen básico de semen debe incluir datos macroscópicos (licuefacción, viscosidad, aspecto, pH y volumen) y microscópicos (concentración, motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides, presencia de leucocitos, presencia de aglutinación) (Oehninger y col., 2007; García y col., 2010; Lineamientos en infertilidad, 2011) **(ver Cuadro 1, 2, 3 y 4. Figura 6).**

PARÁMETRO	REFERENCIA
Volumen	>1.5 ml
pH	>7.2
Concentración total espermática	>39 x 10 ⁶ por eyaculado
Concentración por mL	>15 x 10 ⁶ por mL
Motilidad total	40%
Motilidad progresiva	>32%
Morfología	>4%

Cuadro 1. Parámetros de normalidad del semen (WHO, 2010).

PARÁMETRO	
Normozoospermia	Parámetros de espermatozoides dentro de los límites normales.
Oligospermia	Concentración de espermatozoides inferior a 15x10 ⁶ .
Astenospermia	Movilidad lineal menor del 40%
Teratospermia	Proporción inferior al 4% de espermatozoides morfológicamente normales.
Oligoastenoteratozoospermia	Alteraciones de la movilidad, concentración y morfología.
Azoospermia	Eyaculado sin espermatozoides.
Aspermia	Ausencia de eyaculado

Cuadro 2. Nomenclatura de los parámetros del análisis de semen (WHO, 2010).

Evaluación completa ya incluye la averiguación endocrinológica, estudios de imagen y otras pruebas especializadas:

Evaluación endocrinológica del hombre

Las hormonas más importantes relacionadas son la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), testosterona (T), prolactina (PRL) y hormona estimulante de tiroides (TSH) (Lineamientos en infertilidad, 2011)

Estudios de imageneología

Ultrasonografía transrectal en volúmenes bajos de eyaculado, escrotal puede evidenciar un varicocele (García y col., 2010; Lineamientos en infertilidad, 2011).

Otras pruebas especializadas

Cuantificación de leucocitos en semen, pruebas de anticuerpos, prueba de vitalidad espermática, pruebas de penetración espermática, evaluación genética, mutaciones del gen de la fibrosis quística, anormalidades cromosómicas, microdeleciones del cromosoma Y, fragmentación de ADN espermática (García y col., 2010; Lineamientos en infertilidad, 2011).

INDICE	EXAMINACIÓN	INTERPRETACIÓN
Licuefacción	Inmediatamente después de la eyaculación, el semen es típicamente una masa coagulada semi-sólido. Dentro de unos pocos, el semen por lo general comienza a licuar. La muestra completa por lo general se licua dentro de 15 minutos, aunque rara vez puede tardar hasta 60 minutos o más. Durante la licuefacción, la mezcla suave continua o rotación del recipiente. Si la licuefacción no se ha producido dentro de los 60 minutos, se puede utilizar la mezcla mecánica o puede adicionarse un volumen igual de medio fisiológico, seguido de pipeteo repetido.	La masa firme que se observa es debido a la presencia de sustancias similares al fibrinógeno secretadas por las vesículas seminales, que se activan por enzimas proteolíticas segregadas por la próstata (proteasa, pepsinógeno, amilasa y hialuronidasa) la muestra de semen es licuada. La ausencia de las vesículas seminales o próstata conduce a la falta de coagulación (Pires, 2010).
Viscosidad	Después de la licuefacción, la viscosidad de la muestra se puede estimar por suavemente aspiración en un diámetro ancho (aproximadamente 1.5 mm de diámetro) de la pipeta de plástico desechable, permitiendo que el semen a caer por gravedad y la observación de la longitud de cualquier hilo. También se puede valorar con una varilla de vidrio y la observación de la longitud tras la retirada de la varilla de la muestra. La alta viscosidad puede interferir con la determinación de la motilidad del esperma, la concentración de espermatozoides, la detección de anticuerpos de espermatozoides y la medición de los marcadores bioquímicos.	Una muestra normal sale de la pipeta en pequeñas gotas discretas. Si la viscosidad es anormal, la gota se forma un hilo de más de 2 cm de largo. Si la muestra es altamente viscosa, puede deberse a una disfunción prostática (Poiret y Cherruau, 2005).
Aspecto	Una muestra de semen licuado normal tiene una homogénea, de color gris-opalescente. Puede parecer menos opaco si la concentración de espermatozoides es muy bajo.	El color marrón rojizo cuando los glóbulos rojos están presentes (hemospermia), o amarillo en un hombre con ictericia, tomar ciertas vitaminas o medicamentos.
Volumen	El volumen de la eyaculación es aportado principalmente por las vesículas seminales y de la glándula de la próstata, con una pequeña cantidad de las glándulas bulbouretrales y epididimarias. Permite saber el número total de células de espermatozoides y no espermáticas en el eyaculado. Alternativamente, el volumen se puede medir directamente en un cilindro de vidrio graduado de boca ancha. Estos se pueden obtener comercialmente. El límite de referencia inferior de referencia para el volumen de semen es de 1,5 ml	Bajo volumen de semen es una característica de la obstrucción del conducto eyaculador o ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (CBAVD), pérdida de una fracción de la eyaculación, eyaculación retrógrada parcial o deficiencia de andrógenos. El alto volumen del puede reflejar la exudación activa en casos de inflamación activa de los órganos accesorios.
Ph	El pH del semen refleja el pH de las secreciones de las glándulas accesorias diferentes, principalmente la secreción vesicular seminal alcalina y la secreción prostática ácida. El pH debe medirse después de la licuefacción, preferiblemente después de 30 minutos, pero en cualquier caso dentro de 1 hora de eyaculación ya que está influenciado por la pérdida de CO ₂ que se produce después de la producción. Para las muestras normales, papel de pH en el rango de 6,0 a 10,0 y comparar el color con la tira de calibración para leer el pH. El valor de consenso es de 7.2 como valor umbral más bajo.	Si el pH es inferior a 7.0 en una muestra de semen con un volumen bajo y bajo número de espermatozoides, puede haber obstrucción del conducto eyaculador o ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes. Incrementos de semen de pH con el tiempo, como regulador natural disminuye, por lo que los valores altos de pH pueden proporcionar poca información de utilidad clínica.

Cuadro 3. Examen macroscópico del semen (WHO, 2010).

ÍNDICE	EXAMEN	LÍMITE
Movilidad	La movilidad del espermatozoide en el semen se debe evaluar tan pronto como sea posible después de licuefacción de la muestra, preferiblemente a los 30 minutos, pero en cualquier caso dentro de 1 hora, después de la eyaculación, para limitar los efectos perjudiciales de la deshidratación, el pH o cambios en la temperatura sobre la motilidad. Evaluar al menos 200 espermatozoides en al menos 5 campos. Motilidad progresiva: espermatozoides moviéndose activamente, ya sea de forma lineal o en un gran círculo. Motilidad no progresiva: todos los otros patrones de movilidad con una ausencia de progresión, por ejemplo, nadar en círculos pequeños, la fuerza flagelar apenas desplazando la cabeza, o cuando sólo un latido flagelar se puede observar. Inmovilidad: no hay movimiento.	El límite inferior de referencia para la motilidad total es del 40%. El límite inferior de referencia para la motilidad progresiva es del 32%.
Vitalidad	Se estima mediante la evaluación de la integridad de la membrana de las células, se puede determinar de forma rutinaria en todas las muestras, pero es especialmente importante para las muestras con menos de aproximadamente el 40% de espermatozoides con motilidad progresiva. Esta prueba puede proporcionar un control sobre la evaluación de la motilidad, ya que el porcentaje de células muertas no debe exceder (dentro del error de muestreo) el porcentaje de espermatozoides inmóviles. El porcentaje de células viables normalmente supera a la de células móviles. El porcentaje de espermatozoides vivos se evalúa mediante la identificación de aquellos con una membrana celular intacta, de exclusión de colorante o por hinchazón hipotónica.	El límite de referencia inferior para la vitalidad (espermatozoides membrana intacta) es del 58%.
Concentración	La determinación de la concentración de espermatozoides valora la función testicular y la permeabilidad de los conductos excretores. El número total de espermatozoides por eyaculado y la concentración de espermatozoides se relaciona tanto con el momento de la gestación y las tasas de embarazo y, son predictores de la concepción. Las muestras deben analizarse dentro de 10 a 15 minutos y contar al menos 200 espermatozoides por réplica. El número total de espermatozoides se refiere al número total de espermatozoides en todo el eyaculado y se obtiene multiplicando la concentración de espermatozoides por el volumen de semen. Se recomienda el uso de cámaras de hemocitómetro 100.	El límite inferior de referencia para la concentración de espermatozoides es de 15×10^6 espermatozoides por ml. El límite inferior de referencia para el número total de espermatozoides es de 39×10^6 espermatozoides por eyaculado.
Morfología	Para observar las formas de los espermatozoides se recomienda la preparación de una gota de semen en un portaobjetos, secado al aire, la fijación y la tinción. Examinar el portaobjetos con la óptica de campo claro a 1.000 aumentos con aceite de inmersión. Se relaciona con una serie de dificultades con relación a la falta de objetividad, la variación en la interpretación o mal desempeño en las evaluaciones de control de calidad externo.	El límite inferior de referencia para la morfología normal es del 4%. Ver figura 1.6
Conteo de células no espermáticas	Puede ser indicativo de daño testicular (células germinales inmaduras), patología de los conductos eferentes (penacho ciliar) o inflamación de las glándulas accesorias (leucocitos).	En una concentración superior a 1×10^6 por ml, se debe evaluar su naturaleza (actividad peroxidasa o marcadores leucocitarios).

Cuadro 4. Examen microscópico del semen (WHO, 2010).

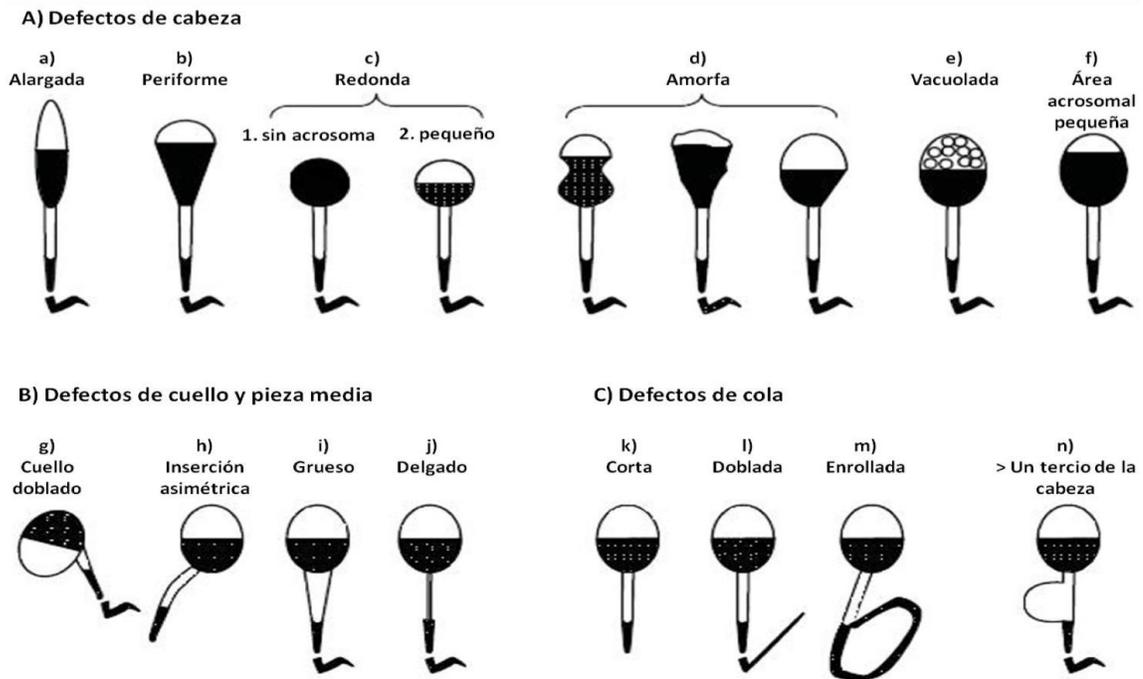


Figura 6. Defectos morfológicos en los espermatozoides
(Tomado y modificado de WHO, 2010).

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

7. REPRODUCCIÓN HUMANA

La fecundación es uno de los procesos biológicos descritos más fascinantes y a la vez más complejos, el cual comienza con el transporte de gametos en el tracto reproductor y concluye con la formación de los pronúcleos y la singamia de los mismos. Este evento fundamental del comienzo del desarrollo de un nuevo organismo implica una serie coordinada de eventos y de interacciones celulares que permiten el encuentro entre el espermatozoide y el ovocito para formar el cigoto (Cánovas, 2008).

Los espermatozoides penetran en el moco cervical e inician el proceso de capacitación que inicia durante el paso de los espermatozoides a través del cuello uterino y que se completa en la trompa de Falopio o durante la incubación in vitro en medio adecuado, se caracteriza por la capacidad adquirida de los espermatozoides de sufrir la reacción acrosómica para unirse a la zona pelúcida y adquirir su motilidad hiperactivada (Speroff, 2012).

La reacción acrosomal consiste en la liberación de enzimas líticas (proteína Hyal5 con actividad hialuronidasa) por parte de la vesícula acrosomal del espermatozoide, que son capaces de dispersar las células de la corona radiada y permitir que el espermatozoide se abra camino hasta alcanzar la zona pelúcida, el estrato glicoprotéico que rodea el ovocito. La unión espermatozoide-zona pelúcida induce la activación y el desprendimiento de otra enzima acrosomal (acrosina) que facilita la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida, para excavar en ella un canal que le permita alcanzar la membrana plasmática, fundirse e incorporar su núcleo y el centriolo. El aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático induce la reacción cortical que, por medio del endurecimiento de la zona pelúcida y la desactivación de las moléculas receptoras de espermatozoides, impide la unión y la entrada de otros espermatozoides (poliespermia), y permite la protección del nuevo individuo que comienza su ciclo vital (Sgreccia y Carrasco, 2006).

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

8. DESARROLLO EMBRIONARIO

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

Cuando ocurre la fertilización del ovocito, se forma el cigoto compuesto de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares (**Figura 7**). A partir de la constitución del cigoto, en el embrión se producen una serie de rápidas divisiones mitóticas y a este periodo celular se le llama segmentación. Mientras el embrión se segmenta es transportado a lo largo de la trompa de Falopio para entrar en el útero. El embrión en su conjunto no cambia de dimensiones y queda encerrado en la zona pelúcida que le protege y le impide adherirse a paredes tubáricas (Sgreccia y Carrasco, 2006; Velázquez, 2009).

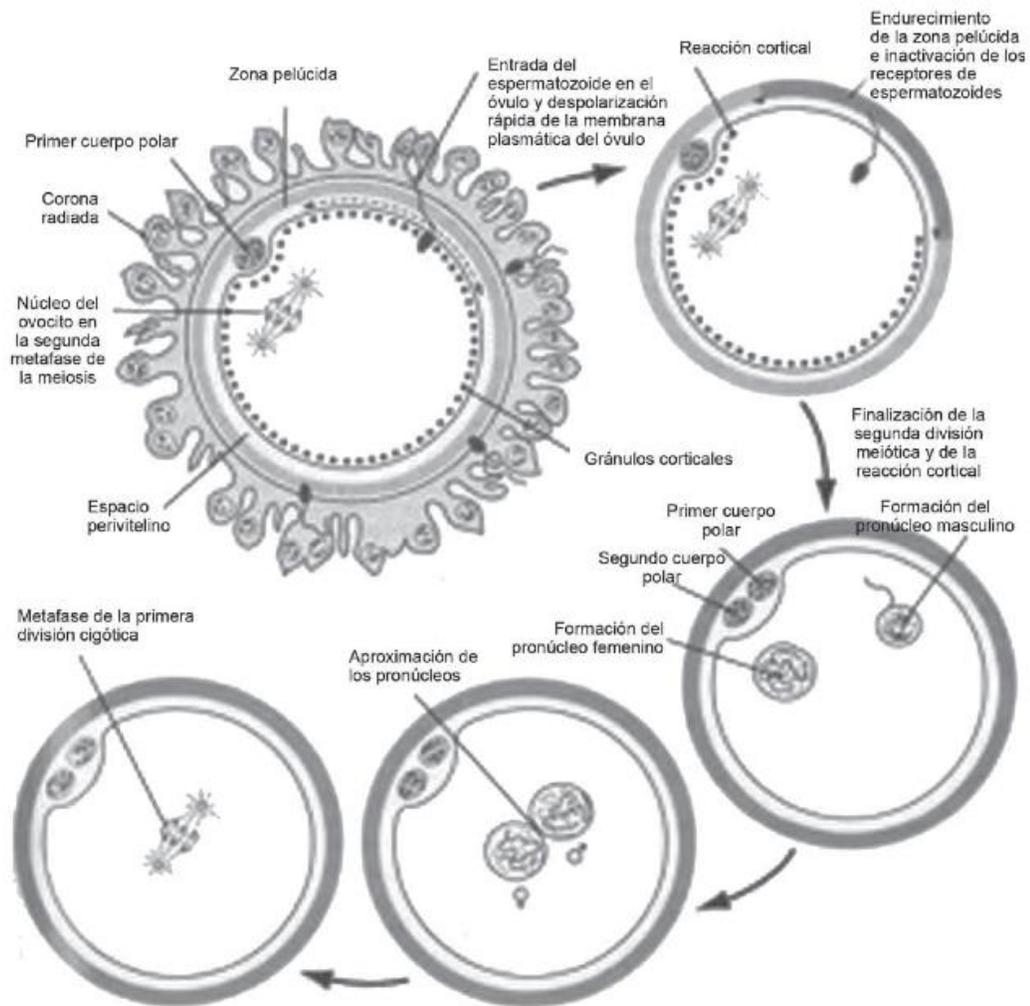


Figura 7. Secuencia de eventos después de la fertilización.
(Tomado y modificado de Velázquez, 2009)

La segmentación está acompañada por crecimiento celular y por tanto subdividen al cigoto en células hijas más pequeñas llamadas blastómeros. Esta etapa de segmentación dura de cuatro a cinco días, terminando con la formación de una esfera sólida de células llamada mórula. Después de la entrada de la mórula en la cavidad uterina, en un estado 8-16 células, esta se compacta produciendo profundos cambios metabólicos y estructurales para iniciar la diferenciación celular y formar un blastocisto con una cavidad grande llamada blastocele. El blastocisto empieza a expresar y transcribir más de 500 genes y es activado para liberarse de

la zona pelúcida. En un polo del blastocisto quedan las células formadoras del embrión, también llamado embrioblasto. Uno o dos días después, las células del embrioblasto se reorganizan formando una estructura discoidal con dos capas de células, el epiblasto y el hipoblasto, constituyendo el disco embrionario bilaminar, es en esta etapa que el blastocisto alcanza la cavidad uterina e inicia su implantación en el endometrio (Sgreccia y Carrasco, 2006; Arteaga y col., 2007; Velázquez, 2009) **(Figura 8).**

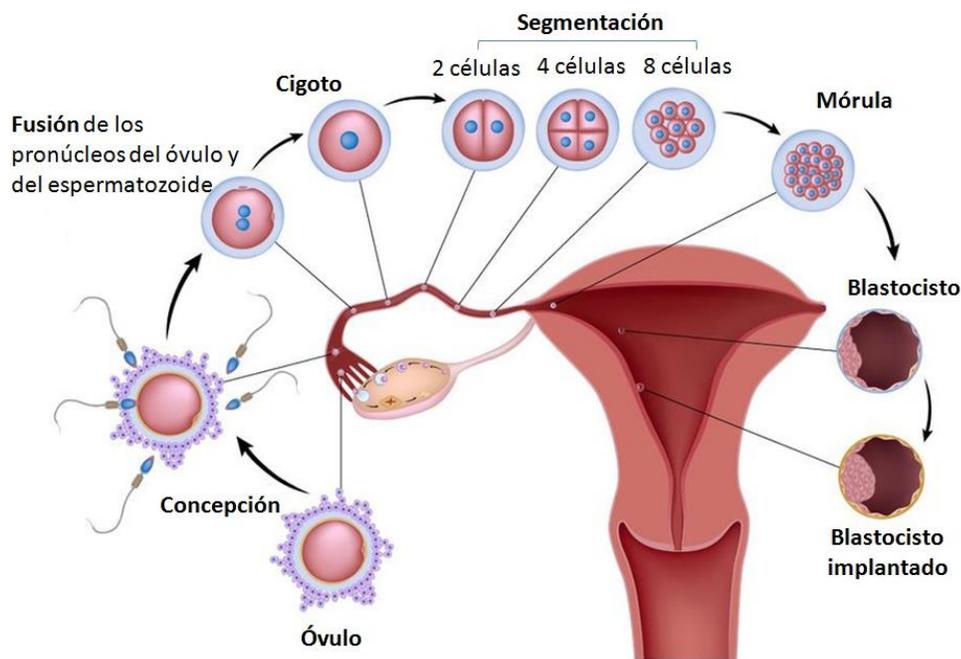


Figura 8. Etapas desde la fecundación hasta la implantación del embrión
(Tomado de Alila/123rf stock photo) .

9. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA (TRA)

Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) abarcan todas las técnicas que implican la manipulación directa de los ovocitos fuera del cuerpo. La primera forma de TRA, y todavía la más frecuente, es la fecundación *in vitro* (FIV). Estas tecnologías son la opción después del fracaso del tratamiento médico o quirúrgico

(Speroff, 2012).

Sin embargo, se han considerado que la Inseminación Intrauterina (IIU) es un forma de técnica de reproducción asistida de baja complejidad, ya que también hay manipulación de gametos (Remohí, 2012).

Inducción de la ovulación.

El objetivo es el desarrollo de un solo folículo. Por ello se debe monitorizar el crecimiento folicular mediante ecografía endovaginal, con la finalidad de evitar desarrollo multifolicular, que pueda provocar gestaciones múltiples o Síndrome de Hiperestimulación ovárica (SHO). Los medicamentos efectivos son: moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (citrato de clomifeno), inhibidores de la aromatasas (letrozol) y, gonadotropinas, que se reservan para el tratamiento de segunda línea, en casos de resistencia a los tratamientos orales. Las indicaciones principales son: mujeres hipogonadotrópicas con hipopituitarismo, o mujeres gonadotrópicas con disfunción hipotálamo hipofisaria (Remohí, 2012; Pardo, 2012).

Estimulación ovárica controlada (EOC).

Se realiza buscando el desarrollo de varios folículos ováricos mediante la administración preferentemente de gonadotropinas, controlando la foliculogénesis mediante ecografía transvaginal. Es importante un control estricto de las dosis y un seguimiento adecuado, ya que dosis excesivas pueden producir síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) ó embarazo múltiple. (Remohí, 2012; Speroff, 2012).

Inseminación intrauterina (IIU).

Es una técnica de reproducción que consiste en depositar espermatozoides de una forma no natural en la cavidad uterina en su periodo ovulatorio. Puede ser homóloga (donante) o heteróloga (conyugal) (Speroff, 2012). Sus indicaciones son:

oligoastenoteratozoospermia con menos de 5 millones de espermatozoides móviles progresivos post-capacitación, con teratozoospermia menor de 4%; incapacidad para depositar el semen en la vagina; factor cervical, endometriosis mínima (Remohí, 2012).

Fertilización *in vitro* (FIV).

Consiste en la fecundación de un ovocito en condiciones de cultivo *in vitro*, previa obtención por aspiración guiada por ultrasonido y preparación de los gametos, para posteriormente transferir los embriones a la cavidad uterina (Remohí, 2012).

La FIV se desarrollo inicialmente como medio para superar la infertilidad debida a enfermedad tubárica irreparable, pero actualmente tiene otras indicaciones. La FIV está indicada principalmente cuando el método ofrece la forma de superar uno o más obstáculos específicos que no puede tratarse de otras formas (Speroff, 2012).

Las indicaciones para realizar un FIV son: factor tubárico, endometriosis, fallo a la inseminación artificial, infertilidad por factor masculino (muestra insuficiente para inseminación artificial, recuento de espermatozoides menor a 5 millones, infertilidad de origen desconocido, falla ovárica y disminución de la reserva ovárica, alta respuesta en ciclo de inseminación artificial, criopreservación de ovocitos en pacientes oncológicas o con patología médica, preservación de la fertilidad (Remohí, 2012).

Fases de la *fecundación in vitro*:

1. Estimulación ovárica controlada. La tendencia es realizar estimulaciones con dosis moderadas, que permita obtener ovocitos de mejor calidad, un mayor número de embriones y una mejoría en la tasa de implantación.
2. Punción folicular. Se realiza después de 36 horas posterior a la administración de la hormona gonadotrópica humana o de un agonista de GnRH (si existe

riesgo de SHO). En el laboratorio de FIV se lavan los ovocitos obtenidos y posteriormente se mantienen en incubación a 37 °C y 6% de CO₂ hasta el momento de la inseminación o ICSI.

3. Fecundación. Se realiza seminograma, swim up o gradientes de densidad, y entre 4 a 6 hrs se inseminan los ovocitos. Cada ovocito se incuba con 50,000-100,000 espermatozoides móviles durante 17 a 20 hrs. Transcurrido este periodo se evalúan los ovocitos en busca de signos de fecundación.
4. Cultivo de embriones. La mayoría de las transferencias se realizan 2 o 3 días después de la fecundación. Sin embargo, también se pueden realizar cuando los embriones están en estadio de blastocisto (día 5 o 6 de desarrollo). Las indicaciones para llevarlos a blastocisto son: fallos de implantación, para observar el desarrollo embrionario, evitar gestaciones múltiples transfiriendo un solo blastocisto, diagnóstico genético implantatorio, cuando se dispone de muchos embriones para congelar.
5. Transferencia embrionaria. La vía vaginal es la técnica más empleada, es rara la transferencia tubárica actualmente. Debe ser lo más atraumática y precisa posible, por lo que resulta recomendable su realización bajo control ecográfico (Remohí, 2012, Speroff, 2012).

Inyección espermática intracitoplasmática (ICSI).

Consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito previamente decumulado y orientado. Las indicaciones del ICSI son: disminución del número de espermatozoides, baja movilidad, menos de 3 millones de espermatozoides móviles progresivos, teratozoospermia severa, anticuerpos antiespermatozoide, paciente con cáncer (semen valioso), alteraciones en la eyaculación (eyaculación retrógrada), ausencia de conductos deferentes, Síndrome de Young, vasoepididimostomía fallida, asovasotomía fallida, obstrucción de ambos deferentes, fallo de recuperación en epidídimo por fibrosis, necrozoospermia, mala calidad ovocitaria, congelación y descongelación de ovocitos (Remohí, 2012).

Esta técnica ha supuesto un avance importante para las parejas infértiles por defectos severos del semen. En estos casos la técnica ICSI da lugar a tasas de fertilización significativamente superiores a la de la FIV convencional sin alteraciones en la calidad embrionaria (Remohí y col., 2008).

De la fecundación al blastocisto en las TRA:

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

Día 0: Día de la punción.

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

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

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

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

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

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

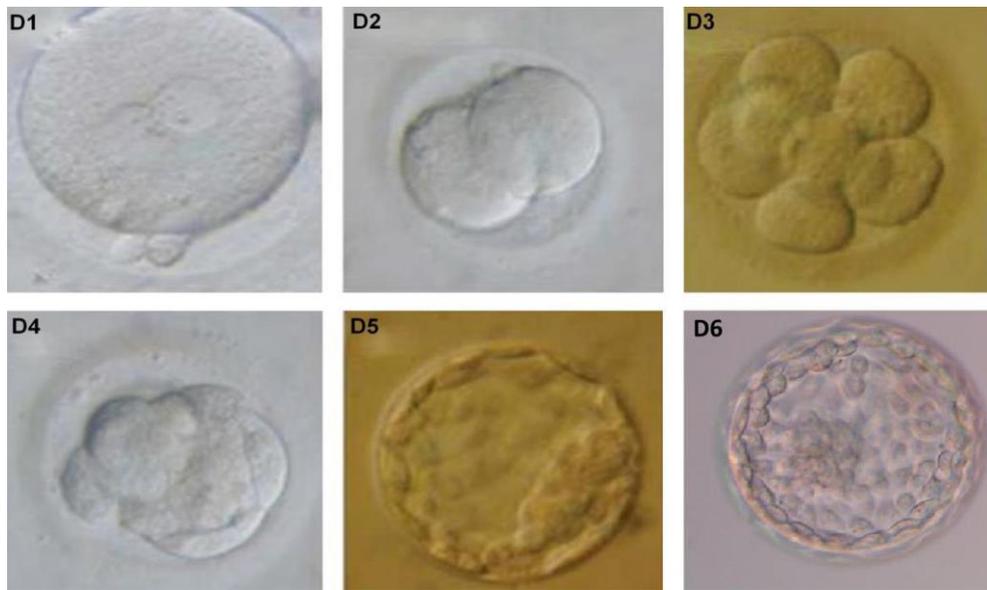


Figura 8. Desarrollo embrionario del Día 1 al Día 5
(Tomado y modificado de Devroey y col., 2009).

10. CARACTERÍSTICAS DEL ADN.

El ADN es el material genético de los genes encargado de codificar el mensaje genético que se transmite a través de proteínas concretas. Los genes son fragmentos de ADN que codifican proteínas específicas. Consta de una doble hélice con 2 cadenas complementarias, enrolladas conjuntamente alrededor de un eje común, formando una hélice. Las dos cadenas se orientan en sentidos opuestos a lo largo de la hélice, una discurriendo en sentido $5' \rightarrow 3'$ y la otra en sentido $3' \rightarrow 5'$. El esqueleto de cada cadena está formado por las moléculas de azúcar (desoxirribosa) alternado con grupos fosfato (Ridley, 2006) .

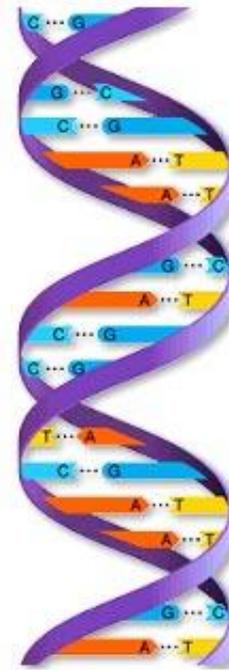
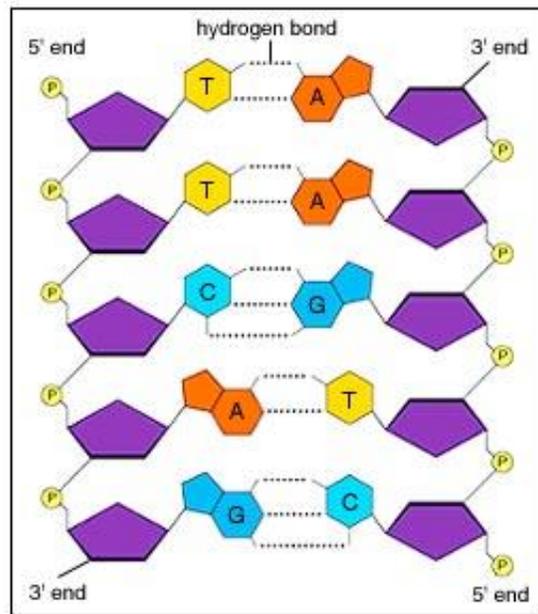


Figura 9. Estructura del ADN
(Tomado de Taller en línea TIC, 2009).

10.1. Fragmentación del ADN

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

El análisis de las características del semen sigue siendo la prueba clínica de

laboratorio más importante que se dispone para la evaluación del factor masculino y es esencial en la valoración de la pareja con dificultades reproductivas. Aunque es posible que los parámetros sistemáticos del semen no siempre sean indicativos de la calidad del ADN del espermatozoide. Además los pacientes pueden tener seminogramas normales y seguir siendo infértiles, debido a un ADN espermático anómalo, ya que el índice de fragmentación espermática no se realiza de manera sistemática (Oehninger y col., 2007).

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

Un número creciente de estudios reportan que el conocer los daños en el ADN espermático, podría ser útil como una herramienta de diagnóstico para la infertilidad masculina. Este criterio de la calidad del esperma es útil como un predictor en el éxito del tratamiento como lo sugiere su asociación con numerosos puntos en el proceso reproductivo incluyendo la fertilización fallida, interrupción en el desarrollo del embrión preimplantatorio, aborto espontáneos y defectos en el nacimiento (Aitken y col., 2007; Bungum y col., 2012).

10.2. Mecanismos de fragmentación del ADN en espermatozoides

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

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

Los mecanismos que contribuyen a incrementar las tasas de daño registrado en el ADN tanto mitocondrial como nuclear del espermatozoide son (Cuadro 4):

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

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

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

Cuadro 5. Mecanismos de fragmentación de ADN de espermatozoides.

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

Diversos autores han correlacionado los valores de fragmentación con los resultados de las TRA para intentar establecer un punto de corte a partir del cual se pueda predecir el resultado de las mismas. Lograrlo supondría aumentar notablemente las tasas de éxito, reducir el número de ciclos innecesarios y conseguir finalmente una eficiencia mayor de la técnica de reproducción asistida empleada lo que causa no sólo en mayores tasas de embarazo sino también en menor costo socio-económico (Morales y col., 2007; Lewis y col., 2013).

Relación entre fragmentación del ADN espermático y desarrollo embrionario.

Las primeras etapas del desarrollo embrionario están sometidas al control materno y la expresión de los genes paternos comienza en el estadio de 4 a 8 células (2 a 3 días después de la fertilización); en ese momento en que el genoma paterno está activo, las alteraciones del ADN de éste se ponen de manifiesto, perjudicando el desarrollo del embrión y produciendo bloqueo embrionario, que puede explicar ciertos fallos de implantación, embarazos bioquímicos o abortos clínicos. Cabe mencionar que pequeños daños del ADN en el espermatozoide son reparados por pre y post-replicación por los mecanismos de reparación materna, pero los daños grandes del ADN no se pueden reparar. Así, hombres infértiles pueden tener

espermatozoides con morfología normal, estas células germinales pueden tener el ADN dañado. Así, los estudios de la integridad del ADN son de suma importancia en la evaluación de todos los hombres antes de las TRA (Morales y col., 2007; Shamsi y col., 2008).

10.3. Técnicas de estudio de la fragmentación del ADN espermático.

En las técnicas de reproducción asistida estos parámetros seminales clásicos no aportan información sobre el estado de la fragmentación espermática. Las técnicas de reproducción asistida suponen un salto en los mecanismos de selección espermática natural y permiten incrementar las posibilidades de que un espermatozoide pueda fertilizar un óvulo con material genómico alterado. Las circunstancias cambiantes obligan al desarrollo de procedimientos alternativos que permitan evaluar la calidad espermática del ADN espermático. La mayoría de los estudios muestran una correlación inversa significativa del daño del ADN espermático y el índice de fertilidad (Lewis y col., 2013).

Las técnicas que existen para estudiar la fragmentación del ADN espermático se pueden dividir en dos grupos. En aquellas que marcan las roturas en la cadena de ADN: TUNEL o Terminal dUTP Nick-End Labeling y ISNT o In Situ Nick Translation. Y las que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos: SCSA o Sperm Chromatin Structure Assay, Estudio cometa, SCD o Sperm Chromatin Dispersion, DBD-FISH o DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization, Naranja de Acridina, Azu.I de Toluidina, Cromomicina A3. En el cuadro 6 se resumen la metodologías empleadas para las alteraciones en el ADN de espermatozoides (Ver cuadro 6).

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

Cuadro 6 Resumen de las metodologías utilizadas para evaluar alteraciones en el ADN de espermatozoides, así como de algunas de sus ventajas e inconvenientes en relación con la aplicación clínica de rutina. TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labeling. ISNT = In situ Nick Translation. SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay. SCD: Sperm Chromatin Dispersion. DBD-FISH: DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization. NA: Naranja de Acridina. AT= Azul de Toluidina. CMA: Cromomicina A3 (Cortés-Gutiérrez y col., 2007.

10.4. Prueba de dispersión de la cromatina del espermatozoide (SCD o Sperm Chromatin Dispersion).

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

La interpretación de los resultados no requiere la determinación de color, no depende de la intensidad de fluorescencia, no necesita de un equipo complejo o de personal especializado (Cortés-Gutiérrez y col., 2007). Por lo tanto, la presencia o ausencia de la fragmentación de ADN se puede determinar simplemente mediante el examen del tamaño del halo por la prueba de la SCD, siendo una técnica sencilla, altamente reproducible y menos cara, con resultados altamente correlacionados con los de otros procedimientos como la SCSA o el TUNEL (Fernández, 2005).

Recientemente, una versión mejorada a fondo se ha desarrollado como el kit de Halosperm ®, lo que resulta en una mejor calidad de la cromatina así como la preservación de la cola., además de que facilita su uso en laboratorios básicos. Esto permite una evaluación fiable de tamaños de halo bajo el microscopio de campo brillante convencional, así como una mejor discriminación de las células de esperma a partir de otros tipos de células (Fernández, 2005).

Dadas las ventajas de la técnica de la SCD es potencialmente utilizada como prueba de rutina en el estudio de fragmentación del ADN espermático en los laboratorios básicos de andrología (Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

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

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

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

Previamente Aravindan y col. en 1997 habían establecido una correlación significativa entre las técnicas SCSA, ensayo cometa y TUNEL para espermatozoides humanos, por tanto los datos obtenidos mediante una técnica se podrían comparar con los obtenidos por las otras dos. Sergerie y col. en el 2005 mediante TUNEL hallaron prácticamente los mismos puntos de corte que Evenson

y col. 2002. Para ello midieron la fragmentación del ADN espermático en un grupo de 66 hombres infértiles ($40,9 \pm 14,3$) y 47 hombres fértiles ($13,1 \pm 7,3$), estableciendo un punto de corte del 20%. Chohan y col. en el 2006 llegaron a la misma conclusión comparando un grupo de 60 hombres infértiles con un grupo de 7 donantes mediante las técnicas SCSA, TUNEL y SCD.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Al utilizar técnicas de reproducción asistida se eliminan las barreras de selección natural que ocurren de manera normal desde la eyaculación hasta que el espermatozoide más apto alcanza y fecunda al óvulo. Se ha propuesto que el daño sobre la molécula del ADN del espermatozoide podría afectar la calidad del embrión, de ahí el interés en desarrollar técnicas analíticas encaminadas a medir la fragmentación del ADN espermático y su resultado en técnicas de reproducción asistida.

Un efecto tardío paterno se ha sido atribuido principalmente a anomalías en la organización de la cromatina espermática (es decir, la reducción de la condensación de la cromatina, anomalías cromosómicas, y el aumento de roturas de la cadena de ADN o de fragmentación). Varios estudios han sugerido que las alteraciones genómicas paternas pueden comprometer la tasa de fertilización y embriones viabilidad/calidad y provocar un aumento de defectos de nacimiento y abortos espontáneos.

Por lo anterior, es probable que haya una relación entre la frecuencia del espermatozoide con fragmentación del ADN y la tasa de fertilización del ovocito, por ello, en este estudio se evaluó la capacidad de fertilización en los procedimientos de reproducción asistida de baja complejidad (IIU), alta complejidad (FIC/ICSI), así como la tasa de implantación; ya que se han observado discrepancias en los estudios que se han realizado en relación al grado de fragmentación y resultados de las técnicas de reproducción asistida.

V. HIPÓTESIS.

Los hombres con parámetros seminales anormales y con problemas de fertilidad, tienen un mayor riesgo de presentar altos niveles de fragmentación de ADN espermática y como consecuencia es probable que este evento afecte la capacidad de fertilización de los espermatozoides repercutiendo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida.

VI. OBJETIVOS.

- Determinar el índice de fragmentación espermática en pacientes con indicación para la toma de dicho estudio y que fueron sometidas a técnicas de reproducción asistida de baja (IIU) y alta complejidad (FIV, ICSI).
- Evaluar si existe una relación entre los parámetros seminales y el índice de fragmentación de ADN espermático de las muestras de pacientes que se sometieron a técnicas de reproducción asistida.
- Analizar la posible relación entre el grado de fragmentación del ADN espermático y la capacidad de fertilización de los espermatozoides en los óvulos, su desarrollo embrionario y en la tasa de embarazo en los distintos procedimientos de reproducción asistida.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

Es un estudio retrospectivo realizado en la Clínica de Reproducción Asistida, Hisparep, Hospital Español de México de marzo de 2013 y concluyó en junio de 2014, en el que fueron analizadas muestras seminales pertenecientes a 38 hombres sometidos a técnicas de reproducción asistidas de baja y alta complejidad. A cada una de las muestras de estos pacientes se les analizó los parámetros seminales y para evaluar la integridad de la cromatina, se obtuvo el índice de fragmentación del ADN espermático. Por indicación médica se tomaron los siguientes parámetros: fallo repetido de embarazo en técnicas de reproducción asistida, abortos de repetición, edad del varón >45 años, varicocele, episodio de fiebre alta en los últimos 3 meses y fueran a ser sometidos a alguna a técnica de reproducción asistida.

Obtención de la muestra.

Las muestras seminales fueron tomadas por masturbación, con un tiempo de abstinencia sexual de 2 a 7 días, directamente en un envase de plástico estéril. Aproximadamente 30 minutos más tarde de la recepción de la muestra, y tras observar su licuefacción a una temperatura a 37°C para evitar una reducción en la movilidad espermática hasta su análisis, se realizó el análisis de los parámetros seminales siguiendo los criterios de la OMS del 2010.

Análisis seminal.

Se llevó a cabo un análisis microscópico y macroscópico de cada una de las muestras:

a) *Examen macroscópico.*

Si transcurridos 60 minutos la muestra no completaba la licuefacción, se realizó de manera mecánica, haciéndolo pasar por una pipeta las veces que fuese necesario.

La viscosidad se evaluó mediante la aspiración suave en una pipeta y caía del semen por gravedad, fue normal si el semen cayó gota a gota. El aspecto del semen se valoró por su color (opalescente), opacidad-transparencia y presencia de cuerpos mucosos gelatinosos. El volumen se midió con pipeta graduada y, finalmente el pH con tiras de papel ColorHast de Merck.

b) Examen microscópico.

Se midió la concentración utilizando una cámara Mackler (Sefi Instrument; Haifa, Israel) contando 3 cuadros al azar. La movilidad se analizó contando 100 espermatozoides libres, nunca los que estaban agregados entre sí o con otras células. Para la vitalidad espermática se preparó una solución de eosina al 0.5% en una solución salina al 0.9% en cloruro sódico, la cual se mezcló con 5 µl de semen. Las características morfológicas se prepararon en extensiones teñidas con Hemacolor (Merck; Darmstadt, Alemania) y 5 µl de semen, utilizando como fijador metanol al 50%. Se utilizaron los criterios de Kruger para la evaluación indicados en el manual de la OMS 2010.

Después se procedió al análisis del índice de fragmentación espermática, el cual fue realizado en la muestra capacitada mediante el SCD test (Sperm Chromatin Dispersion), el cual se basa en la valoración de la presencia/ausencia y tamaños de los halos de dispersión.

c) Técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD).

Se utilizó el equipo Halosperm® (Halotech DNA; Madrid, España), el cual incluye portaobjeto pretratados con agarosa, tubos cónicos de 0.5ml (Eppendorf) con agarosa de bajo punto de fusión, solución de lisis.

1) *Inclusión de la muestra en gel de agarosa.* La muestra de semen se diluyó en medio de cultivo o PBS. El tubo Eppendorf con solución de agarosa se mantuvo

durante 5 minutos en agua a 90-100°C, hasta que la agarosa se disolvió, posteriormente se pasó a un baño de 37°C por 5 minutos. Se añadió 60 ml de la muestra de semen al contenido del tubo de agarosa y se resuspendió. Un portaobjetos pretratado con agarosa se colocó en una superficie fría, a 4 °C. Una vez enfriado el portaobjetos, se depositó la suspensión celular 30 µl, del tubo de agarosa sobre la cara tratada del portaobjetos, se colocó un cubreobjetos. Se introdujo la lámina fría con el portaobjetos, en la nevera y se dejó gelificar la muestra durante 5 minutos.

2) *Procesado de la muestra.* Se incubó el portaobjetos en la solución desnaturalizante (80 µl de ácido desnaturalizante en 10 ml de agua destilada) durante 7 minutos a temperatura ambiente (22 °C). Después se quitó el portaobjetos de la solución desnaturalizante y después se incubó con la solución desnaturalizante, dejándolo incubar durante 25 minutos, con este se eliminan gran parte de las proteínas nucleares. Para lavar la solución se incubó con abundante agua destilada durante 5 minutos. Se levantó el portaobjetos y se introdujo en horizontal en una caja llena de agua y, finalmente, se deshidrató la muestra incubándola durante 2 minutos en gradientes crecientes de etanol (al 70%, 2 minutos; al 90%, 2 minutos y; al 100%, 2 minutos). Se dejó secar a temperatura ambiente.

3) *Tinción de la muestra.* Se mezcló solución de Wright con solución tampón fosfato (1:1) pH 6.68 y se depositó una capa de colorante, en horizontal, que cubrió el microgel seco. Se dejó tiñendo durante 5-10 minutos, para posteriormente ser decantado y lavado suavemente con agua corriente y posteriormente secado a temperatura ambiente.

4) *Conteo e interpretación de resultados.* El porcentaje de fragmentación fue determinado mediante el conteo de 500 espermatozoides por duplicado en microscopio de campo claro con objetivo de inmersión y se calculó el porcentaje

con la siguiente fórmula:

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

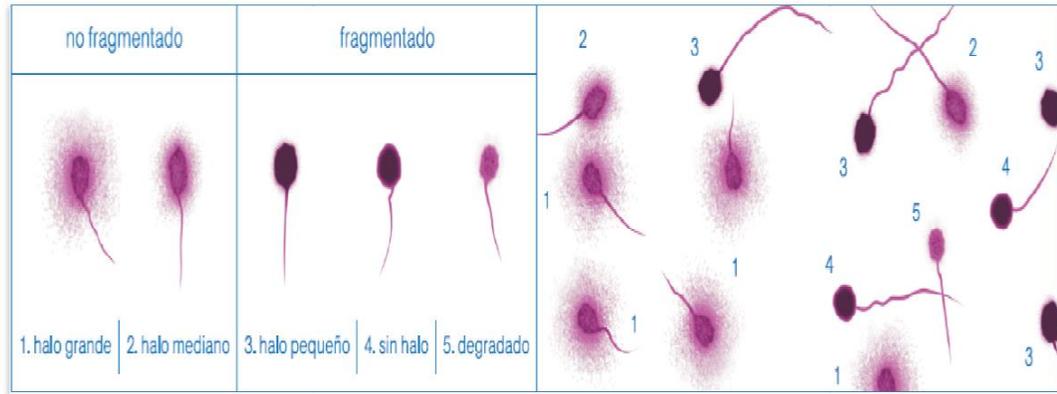


Figura 10. Interpretación según el tamaño del halo de dispersión
(Tomado y modificado de Halosperm®, 2005)

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

Se observan diferentes tipos de espermatozoides:

No fragmentados:

- *Halo grande*: cuando el grosor del halo es igual o mayor a la longitud del diámetro menor del core.
- *Halo mediano*: el grosor del halo está comprendido entre el mayor 1/3 de diámetro menor del core y menor que el diámetro menor del core.

Fragmentados:

- *Halo pequeño*: el grosor del halo es igual o menor de 1/3 de diámetro menor del core, pudiendo ser irregular o inapreciable.

- *Sin halo.*
- *Sin halo y degradados:* sin halo, presentan core fragmentado en gránulos o muestran una tinción muy débil.

d) Técnica de fecundación in vitro e inyección intracitoplasmática espermática.

La estimulación ovárica controlada (EOC) se llevó a cabo por los protocolos de la Clínica de Reproducción Asistida Hisparep. El control de la respuesta ovárica se realizó mediante el seguimiento ecográfico del crecimiento folicular y la determinación de estradiol sérico. La recuperación ovocitaria se realizó a las 34 a 36 horas después de la administración de hCG (Ovidrel® ó Pregnyl®), mediante aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (en caso de FIV ó ICSI), bajo anestesia general endovenosa, evaluación de la fecundación. Se valoró la madurez de los ovocitos recuperados por técnicas de alta complejidad, a los ovocitos en MII se les realizó FIV convencional o ICSI, evaluándose la fecundación a las 18 a 20 horas; la selección embrionaria se llevó a cabo en el día 3 y 5, clasificando a los embriones de acuerdo al número de células, después se transfirió un máximo de 3 embriones en función de la edad e historia clínica de la paciente. La fase lútea se suplementó con 600 mg al día de progesterone vía vaginal (Geslutin®, Asofarma). El diagnóstico de gestación mediante determinación β hCG sérica a los 14 días de la transferencia embrionaria o los 18 de la IIU. Cuando fue positiva (>20 U7ml), se tomó otra β hCG sérica una semana después y se confirmó la gestación a la semana después mediante hallazgo ecográfico de saco gestacional intrauterino. Para valorar el resultado del ciclo de FIV-ICSI se consideraron: tasa de fecundación, calidad embrionaria el día de la transferencia, tasa de embarazo, tasa de aborto bioquímico y de aborto en el primer trimestre.

Criterios de exclusión: parejas con infertilidad de menos de un año, cultivos de semen positivos, no completen la técnica de reproducción asistida, serologías positivas, diabetes mellitus, Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, varicocele

importante (grado 3 y 4), cáncer testicular u otra patología oncológica que en su tratamiento incluyera quimioterapia y/o radioterapia previa, o con datos que apoyen azoospermia obstructiva, embriones que incluyan diagnóstico genético preimplantacional, maduración in vitro, y o otros procedimientos de manipulación embrionaria.

e) Análisis de la capacidad de fertilización de los espermatozoides en los óvulos de pacientes y su posterior desarrollo embrionario.

Los resultados de los procedimientos de reproducción asistida de baja y alta complejidad en fertilización y desarrollo embrionario se consultaron en el archivo del laboratorio de Andrología de la Clínica de Reproducción Asistida Hisparep, Hospital Español de México y los expedientes clínicos de los pacientes. A partir de este archivo se elaboró una base de datos con la que se trabajó.

f) Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en este estudio fueron analizados por la prueba no paramétrica de Wilcoxon para la evaluación de muestras pareadas y la correlaciones fueron establecidas mediante el coeficiente de correlación de Spearman, con un valor de significancia $p < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico GraphPad InStat® Versión 3.0.

VIII. RESULTADOS.

Se analizaron 36 muestras de pacientes con problemas de infertilidad. La edad promedio de los hombres fue de 38.7 ± 6.7 años (rango de 30 a 62) y de las mujeres fue de 34.3 ± 5.2 años (rango de 20 a 43). Presentaron infertilidad primaria 23 parejas (63.88 %) y 13 infertilidad secundaria (36.11%). La media en años de infertilidad fue de 2.7 ± 2.0 años (rango 1 a 9). Y el 77% (28) de los hombres tiene una ocupación en donde permanece la mayor parte del tiempo sentado.

Tabla 1. Se muestra la media \pm desviación estándar de la concentración, la vitalidad, la movilidad por grupos y la morfología que se obtuvo a partir del porcentaje de formas normales y anormales, de éstos últimos se observaron los defectos de la cabeza, pieza media y cola.

Parámetros	Media \pm Desv. estand.
Concentración ($10^6/ml$)	24 ± 19.13
Movilidad	
Progresivos (%)	34 ± 12.31
No progresivos (%)	14 ± 5.51
Inmóviles (%)	50 ± 9.78
Morfología	
Normales (%)	2 ± 1.06
Anormales (%)	97 ± 1.06
Cabeza	96 ± 2.54
Pieza media	89 ± 11.75
Cola	39 ± 10.18

Desv. estand.= Desviación estándar.

Para analizar la integridad de la cromatina espermática de los 36 hombres se obtuvo el Índice Fragmentación del ADN espermático (DFI) en semen fresco, el cual fue de $29.42 \pm 8.65\%$ (rango 14.4 a 58.8).

En la **tabla 2** se observa el DFI espermático de las muestras de semen, con un potencial de fertilización excelente (<15%), alto (15-24%), bajo (25-30%), muy bajo (>30%). Como puede observarse la mayoría de las muestras tienen un DFI con bajo potencial de fertilización (44.4%).

Tabla 2. Número de muestras obtenidas y grado de fragmentación evaluadas, expresadas en porcentajes.

Potencial fertilización	Excelente		Alto		Bajo		Muy bajo		Total de muestras
	DFI%	Nº de muestras	DFI %	Nº de muestras	DFI %	Nº de muestras	DFI%	Nº de muestras	
Fresco (%)	14.4	1 (3.6)	21.9	8 (22.2)	27.0	16 (44.4)	39.7	11 (30.5)	36 (100)

En la **tabla 3** se observa una correlación entre DFI espermático de semen y la movilidad progresiva e inmóvil, los espermatozoides anormales y los defectos de cabeza.

Tabla 3. Índice de correlación entre el DFI espermático del semen y los parámetros seminales (concentración, movilidad progresiva, no progresiva e inmóviles, porcentaje de normales y de anormales, y defectos en los espermatozoides en su porción de cabeza, pieza media y cola).

Parámetros seminales	DFI	
	<i>r</i>	<i>p</i>
Concentración	-0.26	0.11
Móviles progresivos	0.38	0.02
No progresivos	0.32	0.56
Inmóviles	0.32	0.05
Normales (%)	-0.53	0.0007
Anormales (%)	0.53	0.0007
Cabeza	0.49	0.0022
Pieza media	0.21	0.20
Cola	0.18	0.29

r= coeficiente de correlación, p= valor de p (significancia estadística, $p < 0.05$)

Para evaluar el desarrollo embrionario de los óvulos fecundados de pacientes con espermatozoides se revisó la base de datos del laboratorio de FIV de la clínica.

En la siguiente **tabla 4**, se observa que hay un mayor número de procedimientos con ICSI (61.1%), dado que la mayoría de los pacientes tenía un bajo potencial fertilizante se prefirió dicha técnica.

Tabla 4. Número total de procedimientos por cada técnica de reproducción asistida, IIU de semen conyugal de pareja, fecundación in vitro (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), y la combinación de FIV/ICSI; en algunos procedimientos de alta complejidad se emplearon óvulos de donante (OD).

TRA	IIU	FIV	OD/FIV	ICSI	OD/ICSI	FIV/ICSI	Total
Nº de procedimientos	4	7	1	28	2	2	44
Porcentaje (%)	11.1	13.8	3.6	61.1	5.5	5.5	100

En la **tabla 5** se observa el número de óvulos por TRA de alta complejidad, a los cuales se les evaluó fecundación contando 2 pronúcleos (PN) en el día 1. El desarrollo

embrionario se evaluó posteriormente: día 2 (D2) cuando presentaban 4 células, en el día 3 (D3) embriones con 8 células, día 5 (D5) blastocistos tempranos (BT) y cavitados (BC) y en el día 6 blastocistos expandidos (BE) y en eclosión (BEe).

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

TRA	Nº total de óvulos en MII	Fecundación PN	D2	D3	D5	D6
FIV (%)	79 (100)	66 (83.5)	3 (3.7)	7 (8.8)	4 (5.0)	0
OD/FIV (%)	6 (100)	6 (100)	0	0	1 (16.6)	0
ICSI (%)	283 (100)	201 (71.0)	10 (3.5)	33 (11.6)	14 (4.9)	7 (2.4)
OD/ICSI (%)	29 (100)	22 (75.8)	0	8 (27.5)	0	0
FIV/ICSI (%)	20 (100)	13 (65)	0	3 (15)	0	0
TOTAL (%)	417 (100)	308 (73.8)	13 (3.1)	51 (12.2)	19 (4.5)	7 (1.6)

Posteriormente a la obtención de los resultados correspondientes a cada procedimiento con óvulos de pacientes y óvulos de donantes respecto a la fecundación y desarrollo embrionario se realizó una correlación entre el DFI espermático de semen en fecundación y desarrollo embrionario. Como se observa en la **tabla 6**, sólo se encontró correlación significativa en el ICSI y el día 2 y 3 del desarrollo.

Tabla 6. Índice de correlación entre el DFI espermático de semen y la fecundación en las TRA y desarrollo embrionario con óvulos de las pacientes.

	FIV		ICSI	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Fecundación	0.180	0.66	-0.13	0.47
D2 y D3	0.064	0.88	-0.377	0.04
D4 y D5	0.331	0.42	-0.337	0.84

En la **tabla 7** se muestran los resultados de pruebas de embarazo (betas) positivas y negativas, con una tasa de embarazo del 27.2% en todos lo ciclos, predominando en el ICSI (33.3%).

Tabla 7. Se presentan los datos del número de betas positivas, betas negativas y no transferencia de embriones expresado en porcentajes.

TRA	Betas positivas	Betas negativas	No transferidos	Total por procedimiento
IIU (%)	2 (16.6)	2 (6.4)	0	4 (9.0)
FIV (%)	2 (16.6)	4 (12.8)	1 (100)	7 (15.9)
OD/FIV (%)	0	1 (3.2)	0	1 (2.2)
ICSI (%)	4 (33.3)	24 (77.4)	0	28 (63.6)
OD/ICSI (%)	2 (16.6)	0	0	2 (4.5)
FIV/ICSI (%)	2 (16.6)	0	0	2 (4.5)
TOTAL (%)	12 (100)	31 (100)	1 (100)	44 (100)

IX. DISCUSIÓN.

La calidad del esperma se evalúa rutinariamente midiendo la concentración, movilidad y morfología (Organización Mundial de la Salud, 2010). Si bien el análisis de semen convencional puede ser útil como evaluación inicial del estado de fertilidad de un paciente, cada vez hay más evidencia de que tiene un valor limitado en el diagnóstico de la infertilidad masculina o predecir el éxito de la reproducción asistida (Berlinguer y col, 2009).

Uno de los objetivos de este estudio fue analizar la posible relación de parámetros seminales y el DFI espermático, en los resultados se observa la correlación entre la movilidad no progresiva e inmóvil y el DFI, lo que nos indica la posible presencia de ADN fragmentado en este tipo de espermatozoide (Tabla 3). Se sabe que la movilidad es de vital importancia para una fecundación exitosa, disminuyendo la capacidad funcional de los espermatozoides y las tasas de éxito de la TRA (Remohí y col., 2012). También se observó una correlación con los espermatozoides anormales y alteraciones en la cabeza espermática. Los informes sobre la relación entre la integridad del ADN y los parámetros del semen han sido variados, ya que en algunos estudios se observa que la fragmentación del ADN no causa directamente pérdida de la movilidad de los espermatozoides y ambos deben ser considerados como parámetros independientes para la evaluación de la calidad del espermatozoide (Mehdi y col., 2009).

Es importante señalar que la mayoría de los hombres de nuestro estudio permanecen la mayor parte del tiempo sentados debido a su ocupación, lo que aumenta la temperatura escrotal y ocasiona un mayor número de espermatozoides inmaduros en el epidídimo y eyaculado (Dada y colbs., 2003) además de una fuente importante de especies reactivas de oxígeno (Gil-Guzmán y colbs., 2001).

Cabe destacar que los pacientes acudieron por problemas de infertilidad y la

mayoría presentan un potencial bajo fertilizante. Existen evidencias de que la cromatina de los espermatozoides de varones fértiles, resiste mejor el daño a diferencia de la de varones infértiles con parámetros de semen moderadamente bajos (Partykaa y col., 2010).

También se observó que hay una correlación positiva entre el ICSI y el día del desarrollo 2 y 3. Sin embargo, los estudios son controvertidos en cuanto a la relación que existe entre el DFI y la tasa de fertilidad en las TRA. Mientras que en algunos estudios no observan relación entre el DFI y la probabilidad de embarazo (Yilmaz y col., 2010; Hee-Jun y col., 2011); en otros estudios han relacionado la posible influencia de la integridad del ADN espermático con alteraciones en las tasas de fecundación, gestación y embarazo tanto en FIV e ICSI (Chun-Chia y col., 2005; Avendaño y col., 2010).

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

También se ha citado en la literatura que los daños al ADN del espermatozoide puede ser menos informativo en pacientes sometidos a ICSI ya que esta técnica no pasa por todas las barreras de selección naturales tales como la unión a la zona pelúcida, reacción acrosómica y fusión de las membranas de los gametos, y por lo tanto la fertilización con espermatozoides con ADN altamente fragmentado es todavía más posible (Avendaño y col., 2010 y Oehninger y col., 2011). Por otro lado, estos varones pueden ser fértiles y los ovocitos de las parejas pueden tener la capacidad para reparar el daño del ADN, incluso si el espermatozoide inyectado es de mala calidad. Esto es apoyado por los hallazgos de Meseguer y col. (2011), donde los ovocitos de mayor calidad de donantes compensan el impacto negativo

de los daños en el ADN del espermatozoide en el embrión.

El análisis del semen informa sobre el potencial de fertilidad del varón, pero no tiene valor predictivo absoluto de fertilidad, por lo tanto, evaluar el ADN espermático y su relación con los resultados de la TRA resulta de gran interés médico, lo que permitirá tener más información para orientar al paciente sobre los mejores procedimientos y resultados (Cruz y col., 2010). Hoy en día evaluar la integridad del ADN espermático es de suma importancia debido a que alteraciones en la molécula podrían llevar a problemas en la fertilización y posterior desarrollo embrionario (Morales y col., 2007).

X. CONCLUSIONES.

Se determinó en nuestro estudio el DFI de las muestras seminales de los pacientes que consultaron por infertilidad en nuestra clínica, observándose que la mayoría tenía un bajo potencial fertilizante en aquéllos que fueron sometidos a técnicas de reproducción asistida de alta complejidad.

También se observó una correlación positiva entre el grado de fragmentación de ADN y la movilidad progresiva e inmóvil, y la anormalidad espermática, especialmente en la cabeza.

El índice de fragmentación de ADN espermática se relacionó en este estudio con la fecundación, el desarrollo embrionario y el embarazo en las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (FIV e ICSI). Aunque actualmente no se encuentra el estudio del índice e fragmentación de ADN espermática dentro del conjunto de pruebas clínicas de rutina que se ofrecen a los pacientes, el daño del ADN del espermatozoide ha demostrado ser una herramienta prometedora para determinar el potencial fertilizante del paciente y aumentar las probabilidades de éxito del tratamiento.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aitken, R.J., De Iuliis, G.N. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online*, 2007; 14: 727-733.
- Aitken JR and Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 2011; 13: 36-42.
- Álvarez JG. Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Revista Internacional de Andrología*, 2007; 5: 354-363.
- Alila 123rf stock photo, http://www.123rf.com/photo_11578745_early-human-development.html (Consultado el 20 de marzo de 2014).
- Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 1997; 236. 231-7.
- Arteaga MM, García-Peláez I y Gallegos SS. Estatus del embrión humano. *Archivos Mexicanos de Anatomía Nueva Época*, 2007; 2: 51-54.
- Avendaño C, Franchi A, Duran H and Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility and Sterility*, 2010; 94: 549-557.
- Berlinguer, F., Madeddu, M., Pasciu, V., Succu, S., Spezzigu, A., Satta, V., Mereu, P., Leoni, G.G., Naitana, S. Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. *Reprod. Biol. Endocrinol*, 2009; 9,:125.

- Briceño TL, Díaz I, Gómez C, Pablo y Cavelier C, Luis E (2008). Varicocele e infertilidad masculina. *Rev Urol Colom*, 2008; 17: 63-69.
- Bungum, M., Bungum, L., Lynch, K.F., Wedlund, L., Humaidan, P. Giwercman, A. Spermatozoa DNA damage measured by sperm chromatin structure assay (SCSA) and birth characteristics in children conceived by IVF and ICSI. *Int. J. Androl*, 2012; 35: 485-490.
- Cánovas S, Coy P. Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. Artículo de revisión. *Rev Onvest Clin* 2008; 60 (5): 403-412.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology*, 2006; 27: 53-9.
- Chun-Chia H, Pei-Cheng L, Hui-Mei T, Tzu-Chun C, Chung-Hsien L and Maw-Sheng L (2005). Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility and Sterility*, 2005; **84**: 130-140.
- Córdova A. Fisiología Dinámica. Editorial Masson, 1ra edición. Barcelona, 2003; 234-248.
- Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*; 2007; 31: 120-131.
- Cruz I, Colmenares M, Berrueta-Carrillo L, Gómez-Pérez R, Montes H, Berrueta L, Salmen S y Jesús Alfonso Osuna. Evaluación de la calidad del

espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen. *Investigación Clínica*, 2010. **51**, 87-99.

- Dada R, Gupta P, Kucheria K. Spermatogenic arrest in men with testicular hyperthermia. *Teratog. Carcinog. Mutagen*, 2003: 235–243.
- Dohle GR, Diemer T, Giwercman A, Jungwirth, Kopa Z, Krausz C. Guía clínica sobre la infertilidad masculina. *Euro Assoc Urol*, 2010; 1-60.
- Devroey P, Fauser FC and Diedrich K. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Human Reproduction Update*, 2009; 15: 391-408.
- Ehmcke J, Schlatt S. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction*, 2006; 132: 673-680.
- Evenson DP and Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Journal Elsevier Health Theriogenology*, 2006; 65: 979–991.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, 1999; 14: 1039-49.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*, 2002; 23: 25-43.
- Fernández JL, Muriel, V, Goyanes, E, Segrelles, J, Gosálvez, M, Enciso. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved

sperm chromatin dispersion (SCD) test Fertil Steril, 2005; 84: 833-842.

- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R and Alvarez JG. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. Journal of Andrology, 2003; 24: 59-66.
- García FG, Morera MJF, Monzó MA, Morales SG, Fernández CP, Pellicer MA, Jiménez CF. Impacto del factor masculino sobre la infertilidad: papel del urólogo en una Unidad de Reproducción Asistida. Revista Iberoamericana de Fertilidad, 2010; 27: 513-521.
- Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez R, Thomas AJ, Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum. Reprod, 2001; 16: 1922-1930.
- Gil VA, Cardona-Maya W y Cadavid JA. Muerte embrionaria temprana: ¿Tiene influencia en el factor masculino? Urología Experimental e Investigación, 2007; 60: 1057-1068.
- Tomado de: Gilbert, S.F. Biología del Desarrollo. Edit. Médica Panamericana, 7a edición. Buenos Aires, 2005, Argentina: 199.
- Grunewald S, Kriegel C, Baumann T. Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa. Human Reproduction, 2009; 24: 2071-2078.
- Gutiérrez GR. Daño al ADN espermático: aspectos clínicos y biológicos. Revista Cubana de Endocrinología, 2007: 18.

- Halosperm® (2005). Manual del usuario. Biotec Indas Laboratorios.
- Hee-Jun C, Da-Yeon C, Soon-Young C, Jong-Hyun K, Gi-Young K, Jae-Seok L, Hee-Sun L, Myung-Hee K and Sung-Il R (2011). Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 2011; 38: 10-17.
- Hernández-Matos Y, Delgado-Roche L, López-Pérez R, Martínez-Sánchez G, Mallok A. Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Rev de Endoc y Nutr*, 2010; 18: 153-158.
- Lavin N. Endocrinología y Metabolismo. Editorial Marban Libros, 3era edición. Madrid, 2003: 883.
- Lewis S, Aitken J, Nonner S, De Luliis G, Evenson D, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod BioMed Online*, 2013; Vol 27 (4): 325-337.
- Lineamientos en Infertilidad. Evaluación, diagnóstico y tratamiento del varón infértil. *Ginecol Obstet Mex* 2011; 79 (11): 746-753.
- Málaga CY, Ortiz ND, Hernández MI, Tovar JM, Ayala RA. Detención de la espermatogénesis. *Ginecología y Obstetricia*, 2005; 73: 500-508.
- Masson P, Brannigan R. The varicocele. *Urologic Clinics of North America*, Volume 41, Issue 1, February 2014, Pages 129-144.

- Mehdi M, Khantouche L, Ajina M and Saad. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Journal of Andrology*, 2009. 41, 383- 386.
- Mercader A, Buendía P y Simón C. Cultivo prolongado del embrión hasta blastocisto: cocultivo. En: Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J, Cobo A, Romero J, de los Santos MJ y Pellicer A. Editorial Mc Graw Hill Interamerican, 3ra ed. España, 2008: 215-223.
- Meseguer, M., Martínez-Conejero, J.A., O'Connor, E.J., Pellicer, A., Remohí, J., Garrido, N., 2008. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil. Steril.* 89, 1191-1199.
- Moore KL, Dailey AF, Agur AMR, Moore. Anatomía con orientación clínica. Edit Lippincott, 7va edición. España, 2013: 612-619.
- Morales R, Lledó B, Ortiz JA, Rodríguez-Arnedo D, Fabregat A, Bernabeu R (2007). Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 2007; 24: 305-313.
- Niechlag E, Hermann MB, Nieschlag S. *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*. Edit. Springer, 3rd edition, Berlin, 2010: 11-61.
- Olivera M, Ruíz T, Terazona A, Giraldo C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rav Colom Pecua*, 2006; Vol 19 (4): 1-11.
- Oehninger S, Kruger T. *Male Infertility, diagnosis and treatment*. Informa Healthcare. United Kingdom, 1a Edition, 2007: 239-246.

- Pardo L, Scarella C, Fuentes A. Inducción de ovulación: ¿A quién, cómo y cuándo? Rev Obstet Ginecol 2012; 7 (1): 63-68.
- Partykaa A, Niz 'an' skib W and Łukaszewicza E (2010). Evaluation of fresh and frozen- thawed fowl semen by flow cytometry. Theriogenology, 2010; 74: 1019-1027.
- Pérez PE. Atención integral de la infertilidad. Endocrinología, cirugía y reproducción asistida. Edit. Médica Panamericana, 3ra edición. México, 2011: 1-7.
- Pires I. Semen analysis in lab o ratory practice. Revista Iberoamericana de Fertilidad, 2010; 27: 211-221.
- Poirot C y Cherruau B. Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 2005; 39: 225-41.
- Remohí JA, Bellver J, MatorrasW, Ballesteros A, Pellicer A. Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. Edit Médica Panamericana, 4ta edición, Madrid, 2012: 343-347, 467-519.
- Ridley, Matt. Francis Crick: Discoverer of the Genetic Code (Eminent Lives) HarperCollins Publishers, Argentina, 2006: 192.
- Rosas MR. Infertilidad masculina. Causas, diagnóstico y tratamiento. Ámbito Farmacéutico. Divulgación sanitaria, 2007; 26: 70-75.
- Ross HM y Pawlina. Histología texto y atlas color con biología celular y

molecular. Editorial Panamericana, 4ta edición. Buenos Aires, 2004: 684-727.

- Said TM, Gaglani A y Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Onlinem* 2010; 21: 456-462.
- Schlosser J, Nakib I, Carré-Pigeon F, Staerman F. Infertilidad masculina: definición y fisiopatología *EMC Urología*, 2007; 39 (2): 1-6.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G (). Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reproduction*, 2005; 20: 3446-51.
- Sgreccia E y Carrasco PI. El embrión humana en la fase de la preimplantación: Aspectos científicos y consideraciones bioéticas, 2006: 1-43.
- Shamsi MB, Kumar R and Dada R (2008). Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian Journal of Medical Research*, 2008; 127: 115-123.
- Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertility and Sterility*, 2000; 73, 43-50.
- Speroff L, Fritz MA. *Endocrinología Ginecológica Clínica y Esterilidad*. Edit. Lippincott Williams & Wilkins, 8va edición. Barcelona, 2012; 29-50, 159-197, 1249-1291, 1331-1334.
- Stevens A, Lowe J. *Histología Humana*. Edit. Mosby, 3ra edición. España,

2006: 399-408.

- Taitgast I (en línea) http://commons.wikimedia.org/wiki/file:male_anatomy_all.svg (2009) Fecha de consulta 13 de mayo de 2014.
- Taller en línea TIC, 2009, http://adnestructurayfunciones.files.wordpress.com/2009/09/enlaces_hidrogeno.jpg
- Teppa GA y Palacios TA. Evaluación actual de la infertilidad masculina. *Investigación clínica*, 2004; 45: 355-370.
- Velázquez CG. Fisiología de la reproducción humana. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*, 2009; 1: 115-30.
- Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh Urología*. Tomo 1. Edit. Médica Panamericana, 10va edición. España, 2008.
- World Health Organization. "WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen" Cambridge: Cambridge University. fifth Edition (2010).
- Yılmaz S, Zergeroğlu AD, Yılmaz E, Sofuoglu K, Delikara N, Kutlu P (2010). Effects of Sperm DNA Fragmentation on Semen Parameters and ICSI Outcome Determined by an Improved SCD Test, Halosperm. *International Journal of Fertility and Sterility*, 2010; 4: 73-78.