

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
FACULTAD DE MEDICINA  
**HOSPITAL DE ESPECIALIDADES PUERTA DE HIERRO**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS EN REPRODUCCIÓN HUMANA “VIDA”**



Tesis para obtener diploma en el Post Grado de:

**BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION**

**“RESULTADOS REPRODUCTIVOS CON EL USO DE  
DIFERENTES TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA  
EN PACIENTES CON INCREMENTO DE LA  
FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO”**

Presenta:

**DRA. MARIA ELIZABETH BALLESTEROS**

---

**Dr. Efraín Pérez Peña**  
Asesor Académico

---

**Dr. Enesto Pérez Luna.**  
Asesor Operacional

**Guadalajara, Jalisco, México, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

<b>INDICE</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>ANTECEDENTES</b>	7
<b>MARCO TEÓRICO</b>	14
EVALUACIÓN DEL VARÓN INFÉRTIL	14
VARIABLES QUE SE EVALUAN EN EL ESPERMOGRAMA	15
INTERPRETACION DEL ESPERMOGRAMA	16
ADN ESPERMATICO	22
FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	23
MECANISMOS QUE INDUCEN LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	24
TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DEL DAÑO DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO DEL ESPERMATOZOIDE	31
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	37
<b>JUSTIFICACION</b>	38
<b>OBJETIVOS</b>	40
OBJETIVO GENERAL	40

OBJETIVOS PARTICULARES	40
<b>HIPÓTESIS</b>	41
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	42
TIPO DE ESTUDIO	42
UNIVERSO DE ESTUDIO	42
CRITERIOS DE SELECCIÓN	42
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	42
CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN	42
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	42
TAMAÑO DE LA MUESTRA	43
TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	43
DEFINICIÓN DE VARIABLES	43
OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	43
ESTE ESTUDIO SE REALIZO	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
CONSIDERACIONES ÉTICAS	46
RECURSOS	46
<b>RESULTADOS</b>	47
<b>DISCUSIÓN</b>	57

**CONCLUSIONES** 62

**BIBLIOGRAFÍA** 63

## INTRODUCCION

La esterilidad afecta a casi un 20 % de las parejas en edad reproductiva. Este fenómeno afecta a ambos sexos siendo el factor masculino responsable de la mitad de los casos (WHO 2010) por lo que queda fuera de toda duda que el análisis de las características del semen es esencial en la valoración de la pareja con dificultades reproductivas (Morales R., et al 2007).

A pesar de los datos que brinda el espermograma para evaluar la calidad espermática, se estima que aproximadamente un 10 o 15 % de los varones estériles presentan parámetros del análisis espermático dentro de rangos normales los cuales podrían presentar defectos en el ADN de los espermatozoides (Smith R., et al 2007).

Se ha considerado que el daño del ADN espermático es causa importante de infertilidad y ha despertado particular interés debido al riesgo que implica la transmisión de defectos genéticos a la descendencia (Cortes-Gutiérrez El., et al 2007), en especial, cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida, donde no es posible una selección espermática que permita excluir espermatozoides con daño en su código genético (Smith R., et al 2007).

Esto ha llevado al desarrollo de numerosas técnicas para estudiar la integridad del ADN espermático, las cuales han reportado que altos porcentajes de fragmentación del ADN espermático tienen un efecto negativo sobre las tasas de embarazo en distintas técnicas de reproducción asistida (Lewis S., et al 2008).

Diversos estudios han demostrado que los espermatozoides pueden exhibir una alta tasa de daño en el ADN y esta se acentúa en condiciones patológicas que conducen a la infertilidad (Smith R., et al 2007). De esta forma el uso de ciertos fármacos, la contaminación atmosférica, el tabaquismo, los episodios de fiebre alta, una temperatura escrotal elevada, anomalías anatómicas tales como el varicocele o una edad avanzada contribuyen a incrementar las tasas de daño registrado en el ADN espermático (Ji BT. et al 1997) (Weber RF., et al 2005) (Enciso M., et al 2006).

La transferencia de la molécula del ADN integra e intacta desde el espermatozoide al ovulo es crucial para conseguir una fecundación con ciertas perspectivas de éxito.

**Por todo lo anterior, nos dimos a la tarea de evaluar los resultados reproductivos con el uso de distintas técnicas de reproducción asistida en pacientes que presentaron un incremento en la fragmentación del ADN espermático.**

## ANTECEDENTES

El paso inicial en el diagnóstico de la infertilidad masculina se ha basado tradicionalmente en el estudio convencional del semen. Sin embargo, hay significativas limitaciones en cuanto a su capacidad para determinar los mecanismos subyacentes que puedan causarla.

El examen microscópico del semen humano se introdujo como un medio para determinar el potencial de fertilidad de un hombre cuando Van Leeuwenhoek inició la práctica en el laboratorio de andrología en 1677 (Schirren., 1972) (Menkveld R., 2007).

Sin embargo, durante los últimos años, el análisis de los parámetros convencionales del semen ha sido objeto de duras críticas, caracterizándolo como " obsoleto". Su potencial diagnóstico fue cuestionado, sobre todo después de la introducción de técnicas de reproducción asistida (ART) como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (McDonough R., 1997). Sin embargo, la mayoría de los expertos en el campo de la andrología están de acuerdo en que el análisis básico del semen es y seguirá siendo el paso inicial más importante en la evaluación de la infertilidad masculina.

Según las recomendaciones de la Asociación Americana de Urología (AUA) y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM), una evaluación inicial completa del varón infértil debe incluir el registro de una historia médica y reproductiva, un adecuado examen físico y al menos dos análisis de semen (Nallella KP et al., 2006) (Haidl G et al., 2008).

En 2010 la OMS publicó la quinta edición del " Manual del Laboratorio para el examen y el procesamiento del semen humano ", que constituye una versión completamente revisada de las cuatro anteriores (1980, 1987, 1992, 1999) (WHO, 2010) (WHO, 1980) (WHO, 1999). Los valores de referencia se basan en muestras analizadas, según las directrices de la OMS, de 1953 hombres en nueve países de tres continentes que lograron el embarazo en 12 meses o menos.



El nuevo Manual proporciona la descripción detallada de los métodos diagnósticos y sus limitaciones (Jequier AM., 2010), incluyendo las opciones alternativas que permiten a cada laboratorio elegir las pruebas necesarias a aplicar, de acuerdo a sus particulares necesidades (Handelsman DJ., et al 2010).

Sin embargo, una gran limitación a tener en cuenta es que la presencia de un valor por debajo de los de referencia de por sí no puede excluir la posibilidad de lograr un embarazo o, en contraste, un espermograma "normal " no garantiza necesariamente un potencial de fertilización satisfactorio (Nallella KP et al., 2006).

Se estima que aproximadamente el 15 % de los hombres con análisis de semen normales son infértiles (Agarwal A et al., 2005) (Lewis SE et al., 2008), lo cual demuestra claramente, la necesidad de aplicar pruebas más sofisticadas en vista de precisar la etiología funcional de la infertilidad masculina y su relación con el resultado reproductivo.

El estudio de la fragmentación del ADN espermático ha surgido como un potencial causante del fracaso reproductivo masculino y su evaluación ha sido sugerida como un complemento útil a la metodología tradicional de evaluación, especialmente antes de la aplicación de las técnicas de reproducción asistida (ART).

Diversos estudios demostraron que la integridad del ADN de los espermatozoides es un requisito necesario para que la fertilización normal tenga lugar así como la transmisión paterna de la información genética a la descendencia (Benchaib M et al., 2007). En consecuencia, una serie de técnicas se ha introducido en la práctica de laboratorio de rutina, con el objetivo de enriquecer la información del diagnóstico en relación con las características funcionales seminales (Muriel L et al., 2006).

A la luz de la evidencia acumulada de que el daño en el ADN espermático puede estar ligado a resultados clínicos adversos, el examen de la integridad de la

cromatina espermática surge como una nueva herramienta, potencialmente valiosa en el arsenal diagnóstico del laboratorio de andrología (Bungum M et al., 2011).

Se sabe que los espermatozoides con daño en el ADN son capaces de fertilizar en forma eficiente un óvulo (Lopes S et al., 1998) (Aitken RJ et al., 1998). La capacidad del ovocito humano y el embrión para reparar el daño del ADN es, sin embargo, poco entendida y el conocimiento disponible, actualmente se limita al estudio de una serie de genes de expresión que muestran que tanto el ovocito como el embrión están equipados con mecanismos para hacer frente a posibles anomalías en el ADN paterno (Wells D et al., 2005) (Gasca S., 2007).

En primer lugar, la capacidad de los ovocitos para iniciar la reparación, en gran medida, va a depender de la calidad citoplasmática y genómica del ovocito, la cual se ve afectada drásticamente por la edad materna avanzada. En segundo lugar, la calidad del ADN presente en un espermatozoide está siendo cada vez más vinculado a la edad paterna (Wyrobek AJ et al., 2006) y esto puede exacerbar aún más la disminución de la tasa de embarazo observada en las mujeres de edad avanzada (Belloc S et al., 2008).

La presencia de daño en el ADN por encima de un umbral crítico en los embriones generados tanto en in vivo como in vitro se ha postulado como la explicación para el bloqueo observado después de la implantación en embriones con un cariotipo normal. Estudios recientes sugieren que este tipo de daño se expresa durante / después de la implantación y se ha caracterizado como un “efecto paterno tardío” (Tesarik J et al., 2004) (Borini A et al., 2006).

También hay indicios de que los altos niveles de daño del ADN en una muestra de espermatozoides se relacionarían con la probabilidad de no obtener blastocitos (Seli E et al., 2004).

Burrello et al sugieren que hay disociación entre la calidad genómica de la célula germinal y la remodelación espermática que tiene lugar durante el proceso de la espermatogénesis. Es decir, que una célula germinal puede tener su núcleo “perturbado” por apoptosis o ser aneuploide y, aun así, el espermatozoide resultante tendrá una morfología normal (Burrello N et al., 2004).

Por lo tanto, cuando un espermatozoide con morfología normal se microinyecta para realizar un ICSI, no significa necesariamente que la calidad genómica también sea normal. Se ha demostrado que en los hombres con oligozoospermia, la probabilidad de que un espermatozoide con morfología normal pueda ser aneuploide es mucho más alto que cuando el hombre presenta normozoospermia (Burrello et al., 2004). Esto probablemente esté relacionado con la detención de la maduración lo cual se asociaría con alteraciones meióticas.

A lo largo de las últimas dos décadas se han introducido una serie de pruebas para el análisis de la fragmentación del ADN de los espermatozoides. Estas pruebas incluyen: test TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling) (Gorczyca et al., 1993), test ensayo cometa (Hughes C et al., 1996), test DBD-FISH (Breakage Deteccion – Fluorescence In Situ Hibridization), test CMA3 (Chromomycin A3) (Manicardi GC., et al 1995), test Naranja de Acridina, test SCD (Sperm chromatin dispersión test) (Fernandez JL., et al 2003) y SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) (Evenson DP et al., 2002).

Lo cual ha dado lugar a un gran número de estudios que demuestran resultados sumamente diversos, variados y contradictorios. Revisando la literatura disponible hay estudios que han demostrado que el elevado daño del ADN del esperma tiene una estrecha asociación con numerosos eventos adversos, incluyendo la alteración en la fertilización, interrupción en el desarrollo del embrión preimplantatorio, abortos espontáneos y defectos del nacimiento en la descendencia (Evenson DP et al., 2007) (Zini A et al., 2008) (Griffin DK et al., 1995) (Carrell DT et al., 2003).

Otros estudios indican que los espermatozoides con daño del ADN pueden fecundar los ovocitos con éxito y dar lugar a una buena calidad de embrionaria que posteriormente se traducen en la pérdida temprana del embarazo (Morris ID et al., 2002) (Twigg JP et al., 1998) (Tesarik J et al., 2004).

Sin embargo, algunos estudios (Aitken RJ et al., 1998) (Gandini L et al., 2004) sólo encuentran un efecto modesto sobre la concepción en las tasas de FIV convencional y poco, si algún, efecto con la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Bungum M et al., 2004) (Lin MH et al., 2008) (Gandini L et al., 2004) (Collins JA et al., 2008).

Una relación inversa se ha informado entre la probabilidad de lograr un embarazo ya sea por coito natural o mediante la aplicación de técnicas de reproducción asistida (ART) y la presencia de elevados niveles de fragmentación del ADN espermático (Lewis SE et al., 2008) (Muriel L et al., 2006) (Fraser L et al., 2004) (Brugnon F., et al 2006).

Aunque un límite superior para predecir un embarazo es aún objeto de debate (Lin MH et al., 2008) (Collins JA et al., 2008), el valor predictivo de las pruebas de fragmentación del ADN parece ser mayor para la concepción natural e inseminación intrauterina (IIU) (Sakkas D et al., 2010) En general, las muestras con baja fragmentación del ADN presentan mayor probabilidad de embarazo exitoso de origen natural (6,5 a 10,0 veces) o después de la IIU (7,0 a 8,7 veces), en comparación a la FIV estándar ( $\approx 2$  veces) e ICSI ( $\approx 1.5$  veces) en muestras que presentan un elevado daño del ADN (Benchaib M et al., 2007) (Wyrobek AJ et al., 2006).

Esta correlación no siempre se encuentra de manera estadísticamente significativa, pero la tendencia ha sido confirmada por numerosos estudios que demuestran que una elevada fragmentación del ADN espermático es un factor deletéreo para lograr y mantener embarazos (Benchaib M et al., 2007). La pérdida recurrente del

embarazo se asocia con una variedad de anomalías genómicas, incluyendo la fragmentación de ADN espermático (Lewis SE et al., 2008). Un aumento de hasta cuatro veces en el riesgo de aborto espontáneo ha sido reportado en FIV e ICSI en aquellos casos con elevada fragmentación del ADN (Spano M et al., 2005) (Benchaib M et al., 2007) (Acharyya S et al., 2005).

Por otra parte el daño en el ADN paterno debido a la exposición ocupacional por metales, disolventes, pesticidas o fumar se ha relacionado con defectos de nacimiento, enfermedades infantiles o incluso cáncer (Acharyya S et al., 2005). Recientemente, un aumento de la incidencia de enfermedades genéticas, como la esquizofrenia, acondroplasia y el síndrome de Apert ha sido reportado en los niños nacidos de los hombres de edad avanzada con altos niveles de daño en el ADN espermático (Lewis SE et al., 2008).

La identificación de subgrupos específicos dentro de los pacientes infértiles que podría beneficiarse con el diagnóstico a partir de las pruebas que evalúan la fragmentación del ADN espermático probablemente serían los hombres afectados por infertilidad idiopática (Qui Y., et al 2008), los pacientes con cáncer testicular en la enfermedad de Hodgkin en particular después de la quimioterapia y/o radioterapia (Alvarez JG et al., 2003), hombres portadores de una anomalía cromosómica estructural (Perrin A et al., 2009), los hombres infértiles con bajas tasas de gestación y baja calidad embrionaria en ART (Muriel L et al., 2006), los hombres que presentan anomalías morfológicas graves como por ej. teratozoospermia o globozoospermia (Machev N et al., 2005), los casos seleccionados afectados por fuentes potenciales de daño en el ADN tales como varicocele (French DB et al., 2008), aborto espontáneo (Zini A., 2008) y procesos inflamatorios o infecciosos del tracto genital (Benchaib M et al., 2007).

El examen preciso y detallado del daño en el ADN espermático en pacientes cuidadosamente seleccionados, en combinación con la evaluación convencional del semen podría desempeñar un papel de suma importancia, ya sea para la prevención

o la corrección de patologías subyacentes en la evaluación previa a la realización de las TRA (Benchaib M et al., 2007) (Aitken RJ., 2010).

## MARCO TEÓRICO

Ochenta y cinco por ciento de las parejas son capaces de concebir después de un año de relaciones sexuales sin protección; el 15 % restante no lo logra (Lipshultz L., 1997). De estos últimos, en aproximadamente 30 %, el factor masculino es responsable por si solo y en 20 %, existe combinación con el femenino; por lo tanto, el factor masculino está involucrado en casi la mitad de los casos que acuden a consulta por problemas de fertilidad (Wong WY., 2000).

Tradicionalmente la evaluación de la pareja infértil se inicia después de un año de intentos, hoy en día este patrón ha sido modificado en vista de que muchas parejas inician su descendencia tardíamente por cuestiones no médicas. De ahí que el especialista deba comenzar el estudio del hombre en el momento de la primera consulta.

## EVALUACIÓN DEL VARÓN INFERTIL

El manejo debe iniciarse con la historia clínica y el examen físico, seguido por los exámenes de laboratorio pertinentes.

La historia clínica debe ser lo más completa posible permitiendo la investigación de factores de riesgo para la infertilidad. En efecto, excepto causas específicas, una patología general puede repercutir en la espermatogénesis.

En lo que respecta a la exploración física esta debe ser completa examinando pene, testículos, epidídimo y conductos deferentes y observando la normalidad de los caracteres sexuales secundarios.

De primera intención el análisis del semen es la prueba más importante en el inicio del diagnóstico de la infertilidad masculina y debe ser necesariamente realizado por técnicos entrenados para asegurar la confiabilidad de sus resultados. Un espermograma básico debe incluir un análisis físico o macroscópico y un estudio microscópico. Para la correcta interpretación del resultado, el espermograma debe contener la información referente a la obtención de la muestra y al tiempo de

abstinencia sexual previo a la recolección de la muestra. Generalmente se recomienda de 3 a 6 días de abstinencia y la forma de recolección más recomendada es la masturbación. Los índices normales se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Índices de normalidad del semen (WHO, 2010).

Parámetro	Límite inferior normal
Volumen (mL)	1.5 (1.4-1.7)
Nº total de espermatozoides ( $10^6$ por eyaculado)	39 (33-46)
Concentración ( $10^6$ por mL)	15 (12-16)
Motilidad total (Progresiva y no progresiva, %)	40 (38-42)
Motilidad progresiva (Progresiva, %)	32 (31-34)
Vitalidad (Espermatozoides vivos, %)	58 (55-63)
Morfología (Formas normales, %)	4 (3-4)
pH	$\geq 7.2$
Leucocitos peroxidasa-positivos ( $10^6$ por mL)	$<1.0$
Prueba de MAR (Espermatozoides motiles con partículas fijas, %)	$<50$
Prueba de microesferas con inmunoglobulinas (Espermatozoides con microesferas fijas %)	$<50$
Zinc seminal (umol/eyaculado)	$\geq 2.4$
Fructuosa seminal (umol/eyaculado)	$\geq 1.3$
Glucosidasa neutra seminal (mU/eyaculado)	$\geq 20$
(Correspondientes al 5º centil con intervalo de confianza de 95 %)	

MAR test: Mixed agglutination reaction test

## VARIABLES QUE SE EVALUAN EN EL ESPERMOGRAMA

El examen básico de semen (Tabla II) comprende la evaluación de sus características fisicoquímicas (volumen, pH, viscosidad, aglutinación), aspectos citomorfológicos (concentración y grados de movilidad espermática, morfología por criterios estrictos, leucocistospermia), aspectos funcionales (vitalidad, integridad de membranas), presencia de anticuerpos antiespermáticos (inmunoesferas, MAR test), estudios microbiológico (espermocultivo y pruebas de sensibilidad, anticuerpos seminales anti-Chlamydia trachomatis, determinación de Mycoplasma y Ureaplasma) y de marcadores glandulares (fructuosa, alfa glucosidasa).



Asimismo, se han incluido otras pruebas, como la recuperación de espermatozoides móviles (REM), que poseen valor pronóstico y potencial terapéutico a la vez.

La evaluación seminal se realiza para identificar causas de infertilidad, y poder predecir o detectar cambios en el potencial de fecundación. Sin embargo, estos objetivos no son fácilmente alcanzables, ya que el éxito para la predicción de fertilidad está limitado por las características del espermatozoide, el proceso mismo de la fecundación, que es complejo y multifactorial, y por los ensayos para evaluar la calidad espermática in vitro.

Tabla II. Examen básico de semen.

<b>Características del plasma seminal</b>	<b>Biofísicas ( Volumen, viscosidad) Bioquímicas (pH, marcadores glandulares: fructuosa, alfa glucosidasa)</b>
<b>Características de los espermatozoides</b>	Concentración Movilidad Morfología (criterios estrictos) Vitalidad (coloraciones vitales, HOST) Separación de fracción móvil tipo alfa
<b>Identificación de células seminales</b>	Leucocitos seminales Células germinales inmaduras
<b>Inmunológicas</b>	Anticuerpos anti espermáticos
<b>Microbiológicas</b>	Cultivo seminal Anticuerpo anti-Chlamydia.-trachomatis
<b>Funcionalidad de los espermatozoides</b>	Reacción acrosómica Unión a zona pelúcida Penetración espermática EROS Integridad del ADN

## INTERPRETACIÓN DEL ESPERMOGRAMA

### Análisis macroscópico:

#### Coagulación:

El semen se emite en estado líquido pero rápidamente se transforma en un estado semisólido. La coagulación se produce por efecto de la semenogelina, producida en las vesículas seminales.

### Licuefacción:

Se produce por acción de la serin- proteasa denominada antígeno prostático específico (PSA) en cuya activación interviene la kalikreina glandular humana 2 y el zinc del fluido prostático. Además del PSA, otros factores influyen en la licuefacción del coágulo. Normalmente toma 15 minutos a temperatura ambiente aunque raramente puede tomar hasta 60 minutos o más (WHO, 2010).

La adecuada licuefacción es indicativa de un normal funcionamiento prostático (Jorgensen, 2001).

### Viscosidad:

Tras la licuefacción, la viscosidad de la muestra puede estimarse aspirándolo gentilmente en una pipeta de aproximadamente 1.5 mm de diámetro, y permitiendo que caiga por gravedad observando la longitud del filamento. Una muestra normal deja la pipeta en pequeñas gotas. Si la viscosidad es anormal, la gota formara un hilo > 2 centímetros (WHO, 2010).

### Volumen:

El volumen normal del eyaculado tras 3 a 5 días de abstinencia es de 1.5 a 6 ml. El líquido seminal es producido fundamentalmente por las vesículas seminales y la próstata con una pequeña cantidad procedente de las glándulas bulbouretrales y el epidídimo.

### pH Seminal:

El pH del semen refleja el balance entre los valores de pH de las diferentes secreciones glandulares, principalmente la secreción alcalina de las vesículas seminales y la secreción ácida de la próstata

### **Análisis microscópico:**

#### Aglutinación:

Se considera que hay aglutinación cuando los espermatozoides móviles están unidos entre sí por la cabeza o por la cola, bien por la cabeza con la cola.

La adherencia de espermatozoides inmóviles uno con otro, o espermatozoides móviles a fibras de mocos, otras células o residuos celulares se considera agregación no específica (WHO, 2010).

El estudio de la aglutinación se hace a 10 aumentos, examinando al menos 10 campos. Si se observan grupos de espermatozoides unidos entre sí, se deben analizar a 40 aumentos con el fin de discriminar entre aglutinación y agregación.

La aglutinación puede sugerir infertilidad de origen inmunitario, pero su presencia no indica necesariamente la existencia de trastornos inmunitarios. Para descartar un posible origen inmunitario, se debe realizar una prueba inmunológica, como puede ser la prueba de reacción de antiglobulinas mixta (Mixed Antiglobulin Reaction Test, MAR test). Esta prueba consiste en mezclar la muestra seminal en fresco no tratada con partículas de látex recubiertas con anticuerpos antiespermatozoides humanos (IgG O IgA). A esta mezcla se le añade un antisuero anti-Ig G monoespecífico humano. La formación de aglutinados entre partículas y espermatozoides móviles indica la presencia de anticuerpos antiespermatozoides IgG o IgA.

#### Conteo Espermático:

El límite inferior de referencia para concentración espermática es  $15 \times 10^6$  espermatozoides por mililitro. El límite de referencia para espermatozoides totales es  $39 \times 10^6$  por eyaculado.

Para realizar el recuento espermático es recomendable utilizar una cámara hemocitométrica. La cámara de Neubauer se ha definido como el patrón oro de las cámaras para el recuento espermático, aunque la cámara de Makler es la más utilizada en la práctica rutinaria.

#### Motilidad espermática:

Se gradúa como sigue:

- a) Motilidad progresiva (PR): Espermatozoides moviéndose activamente, ya sea lineal o en círculos grandes, sin importar la velocidad.

b) Motilidad No-progresiva (NP): Todos los demás patrones de motilidad con ausencia de progresión.

c) Inmovilidad (IM): Sin movimiento.

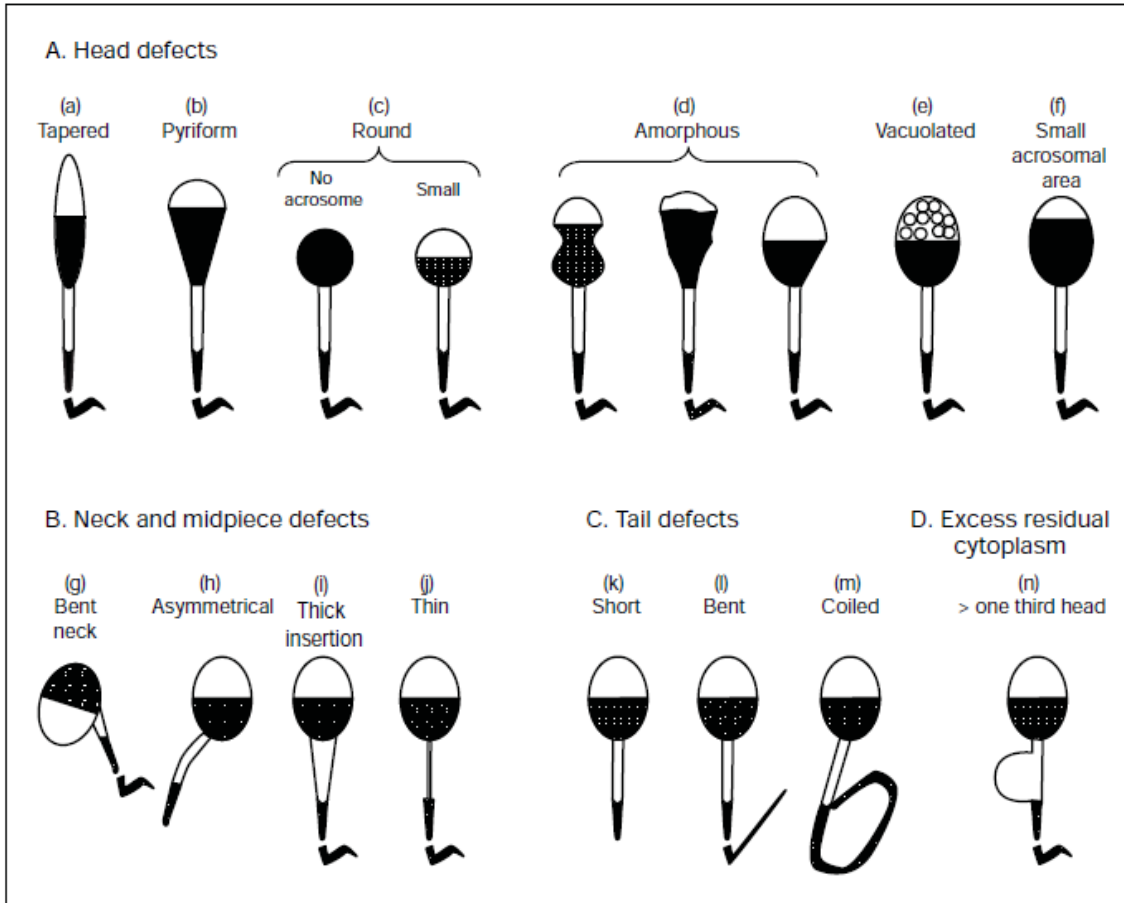
El límite bajo para motilidad total (PR+NP) es 40%. El límite bajo de referencia para motilidad progresiva (PR) es 32%.

### Morfología:

Existe una gran variabilidad en la morfología espermática, lo que dificulta establecer cuál es la apariencia normal de los espermatozoides con capacidad fertilizante. Los criterios establecidos para definir un espermatozoide como normal se basa en los criterios estrictos de Kruger. Cualquier forma borderline debe ser considerado como anormal. Sin embargo, el amplio espectro de formas de espermatozoide convierte en difícil establecer una línea clara entre espermatozoide normal y borderline. Así uno de los problemas a la hora de evaluar morfología espermática es la reproductibilidad interobservador.

En el último manual de la OMS, el valor inferior de referencia para las formas normales es de 4 %, lo que hace pensar que la morfología espermática es cada vez menos considerada como un factor relevante en la capacidad de fecundación de una muestra de semen.

Figura I. Defectos morfológicos en los espermatozoides (WHO 2010)

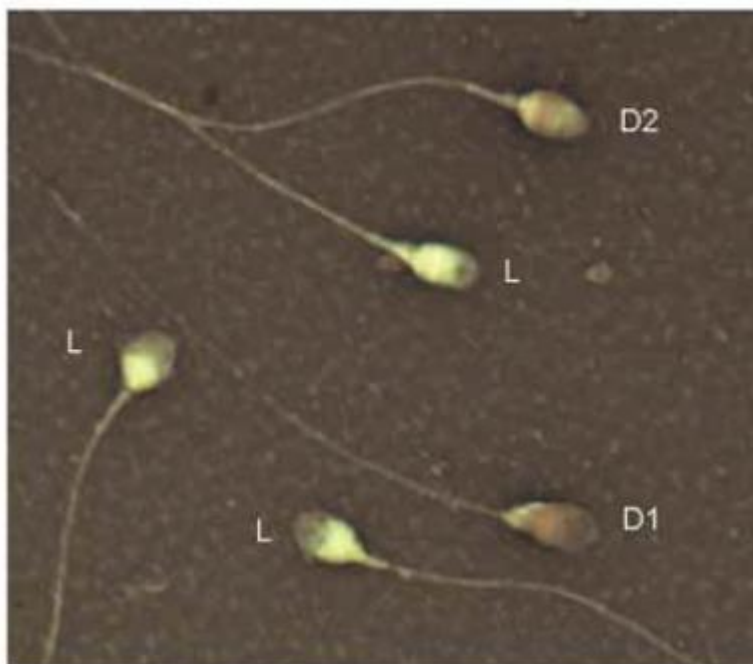


Adapted from Kruger et al., 1993 and reproduced by permission of MQ Medical.

Vitalidad:

Es de especial importancia para muestras con menos de 40% de espermatozoides móviles progresivos.

El porcentaje de espermatozoides vivos es establecido identificando aquellos con una membrana intacta, por tinción o inflamación hipotónica. En la siguiente figura, se aprecia un frotis con Eosina–nigrosina, donde se puede observar en óptica de luz. Los espermatozoides con cabeza roja (D1) o rosa oscuro (D2) son considerados muertos, mientras que aquellos con cabeza blanca (L) o rosa pálido son considerados vivos (membrana intacta) (WHO, 2010).



Con base a las alteraciones en los índices del análisis del semen se muestra la nomenclatura en el Tabla III.

Tabla III. Nomenclatura de los índices del análisis del semen (WHO 2010)

<b>Normozoospermia</b>	Número de espermatozoides totales, de móviles progresivos y de morfológicamente normales, igual o por encima de los límites de referencia inferior establecidos
<b>Oligozoospermia</b>	Número de espermatozoides totales por debajo del límite de referencia inferior
<b>Astenozoospermia</b>	Número de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite de referencia inferior
<b>Teratozoospermia</b>	Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales por debajo del límite inferior de referencia
<b>Oligoastenoteratozoospermia</b>	Es una combinación de las tres anteriores
<b>Azoospermia</b>	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado
<b>Aspermia</b>	Sin eyaculado

<b>Criptozoospermia</b>	Espermatozoides ausentes en la preparación en fresco pero observables en el sedimento del semen centrifugado
<b>Necrozoospermia</b>	Espermatozoides que no son viables (más del 75%)
<b>Hipospermia</b>	Volumen del semen < 1.5 mL
<b>Hiperespermia</b>	Volumen de semen > 5.5 mL
<b>Piospermia</b>	Leucocitos presentes en el eyaculado por arriba del límite inferior establecido
<b>Hemospermia</b>	Presencia de eritrocitos en el eyaculado

## ADN ESPERMÁTICO

La formación de los espermatozoides maduros es un proceso complejo, el cual comprende una serie de divisiones mitóticas y meióticas, cambios en la arquitectura citoplasmática, la sustitución de histonas por protaminas, las cuales son ricas en arginina y poseen residuos de cisteína que forman enlaces de disulfuro que confieren un alto grado de compactación a la cromatina espermática madura.

El empaquetamiento de la cromatina de las células espermáticas es completamente diferente al de las células somáticas (Ward, 1993) (Barone et al., 1994). El empaquetamiento del ADN dentro del núcleo espermático de mamíferos representa uno de los casos más extremos de organización del ADN.

La cromatina espermática de los mamíferos se divide en tres dominios estructurales:

- ✓ El ADN que se encuentra enrollado en toroides por medio de protaminas y que representa la mayor parte del ADN espermático.
- ✓ El ADN que permanece unido a histonas, que constituye un porcentaje mucho menor (2-15 %).
- ✓ El ADN que se une a la matriz extracelular espermática en las regiones de anclaje a la matriz (MARs) a intervalos regulares de aproximadamente 50 kb.

De acuerdo a Sakkas y col los espermatozoides humanos contienen altos porcentajes de protaminas, más del 85%, las cuales poseen la mitad del peso molecular de las histonas por lo cual el ADN de los espermatozoides se encuentra seis veces más compactado que el del cromosoma mitótico y se organiza en bucles

de menor tamaño que los de las células somáticas. Todo lo anterior le confiere al espermatozoide una estructura muy estable y rígida.

La mayoría de las técnicas existentes para el estudio de cualquier peculiaridad en este tipo celular deberá sortear esta barrera física (Manicardi., et al 1995) (Gosálvez., et al 2007).

## FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

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 problemas reproductivos. La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) estableció una serie de parámetros básicos que se deben analizar en el estudio del factor masculino de forma rutinaria; aun así, se estima que aproximadamente un 10 a 15 % de los varones estériles presentan parámetros seminales dentro de rangos normales (Morales y col., 2007).

En busca de nuevos parámetros que permitan discriminar mejor entre pacientes fértiles e infértiles y que sirvan para predecir entre los resultados en reproducción, surge el estudio de la integridad del ADN espermático. La fecundación implica la interacción directa entre el ovulo y el espermatozoide, la fusión de las membranas celulares y la unión de los genomas de los gametos masculino y femenino y, obviamente, la integridad del ADN y la cromatina espermática son esenciales para la correcta transmisión de la información genética a las siguientes generaciones. Hay multitud de evidencias que indican que anomalías en la cromatina o el daño en el ADN podrían influir en la infertilidad masculina y que los hombres infértiles tienen una mayor proporción de células espermáticas con el DNA fragmentado que los controles fértiles (Irvine et al., 2000) (Saleh et al., 2002) (Zini & Libman., 2006).

En las últimas décadas ha aumentado el interés en el estudio de la calidad del ADN de los espermatozoides, debido especialmente al uso, cada vez más frecuente, de técnicas de reproducción asistida. El uso de procedimientos, como la ICSI, que pasan por alto las barreras de la selección natural de espermatozoides para la fecundación, ha hecho que se tome conciencia de la posibilidad de transmisión de



enfermedades genéticas (Cox GF et al., 2002) (Lewis SE et al., 2008). Una mayor incidencia de malformaciones y enfermedades se han encontrado en los hijos de parejas con subfertilidad (> 12 meses hasta lograr la concepción) ya sea por reproducción asistida (ART) o inclusive, concebidos espontáneamente. Debido a que una elevada fragmentación del ADN espermático es más frecuente en estas parejas, el ADN dañado puede ser un factor que contribuye a las anomalías en algunos de estos casos (Basatemur E et al., 2008). Los cánceres infantiles como la leucemia, así como el autismo se han asociado con pobre integridad del ADN de espermatozoides, y se encontró que estos efectos se relacionan con la influencia del hábito tabáquico de los hombres (Aitken RJ et al., 2007) (Ji BT et al., 1997) (Sorahan T et al., 1997).

## **MECANISMOS QUE INDUCEN LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO**

La rotura de la hebra de ADN en los espermatozoides se atribuye a distintos motivos, pero básicamente se han propuesto tres hipótesis para explicar cómo se produce este daño en el ácido desoxirribonucleico:

- ✓ Defectos en la remodelación de la cromatina espermática
- ✓ Estrés oxidativo
- ✓ Apoptosis

### Defectos en la remodelación de la cromatina espermática.

El complejo proceso de intercambio de histonas por protaminas, que tiene lugar durante la espermiogénesis, requiere que se produzcan roturas a lo largo de la cadena de ADN para eliminar el estrés torsional que resulta de la eliminación de histonas y la pérdida de los nucleosomas (McPherson & Longo. 1992) (Sakkas et al., 1995) (Levesque et al., 1998) (Meyer-Ficca et al., 2005). Es necesario que este proceso sea regulado de manera estricta para asegurar que todas las roturas sean reparadas de manera correcta (Meyer-Ficca et al., 2005) (Meyer-Ficca et al., 2011).

Varios autores han postulado que si la espermatogénesis se ve alterada por cualquier razón, las roturas creadas para eliminar el estrés torsional podrían quedar sin reparar y el espermatozoide, carente de capacidad de reparación por sí mismo, sería liberado del epitelio germinal llevando estas roturas en el ADN (Ward & Coffey., 1991) (Sakkas et al., 1999) (Agarwal & Said., 2003).

### Estrés oxidativo

Esta hipótesis propone que la fragmentación del ADN podría ser consecuencia del estrés oxidativo en el tracto reproductivo masculino. El estrés oxidativo celular es la consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los mecanismos de defensa que posee la célula. Las ROS son agentes oxidantes generados como resultado del metabolismo del oxígeno que incluye radicales (moléculas altamente inestables por poseer un electrón desapareado) y no radicales. Pueden oxidar rápidamente otras biomoléculas cercanas ejerciendo una influencia, positiva o negativa, sobre su función celular normal. Entre las ROS se encuentra el hidroxilo (OH), el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el óxido nítrico y peroxinitrito, también son consideradas una subclase de ROS (Darley-Usmar et al., 1995).

Cuando las células germinales masculinas se están diferenciando en los testículos, son muy sensibles al estrés oxidativo y dependen en gran medida de la protección que ofrecen las células de Sertoli, las cuales poseen altos niveles de actividad superóxido dismutasa así como actividad reductasa, transferasa y peroxidasa.

Una vez que los espermatozoides son liberados del epitelio germinal, ya no pueden beneficiarse de la capacidad defensora de las células de Sertoli y, como células aisladas, los espermatozoides son muy vulnerables al estrés oxidativo.

Una de las razones por las que los espermatozoides de mamíferos son tan vulnerables al estrés oxidativo es que, justo antes de ser liberados del epitelio germinal, se despojan de la mayoría de su citoplasma, en el cual se encuentran la mayoría de las enzimas oxidantes que protegen a estas células del estrés oxidativo.

Debido a esta carencia de protección intrínseca contra el estrés oxidativo, estas células son muy dependientes de las propiedades antioxidantes del líquido seminal en el que se encuentran. Es por esta razón que el líquido seminal es uno de los medios antioxidantes más poderosos que se conocen y contiene formas muy especializadas de enzimas antioxidantes.

A pesar de la inherente vulnerabilidad al ataque oxidativo, los espermatozoides también generan ROS. El propósito de la generación de estas ROS parece ser la regulación de procesos biológicos críticos, como es la capacitación, sin los cuales la fecundación sería imposible. Los espermatozoides de mamíferos son eyaculados en un estado inmaduro, sin capacidad para fecundar. Sin embargo cuando estas células ascienden por el tracto genital femenino, son transformadas fisiológicamente mediante el proceso de capacitación, de manera que se vuelven competentes para reconocer el ovocito e iniciar la compleja cascada de interacciones celulares que resultan en la fecundación. Una vez capacitados, los espermatozoides son capaces de unirse a la zona pelúcida del ovocito. Hay muchas evidencias que sugieren que el espermatozoide necesita pequeñas cantidades de ROS para que la capacitación, hiperactivación y la reacción acrosómica tengan lugar (de Lamirande & Gagnon. 1995) (de Lamirande 1997).

Sin embargo, las ROS deben ser continuamente inactivadas para mantener sólo esa pequeña cantidad necesaria para preservar la función celular. Una excesiva generación de ROS en el semen puede causar modificaciones químicas en el ADN espermático nuclear, así como dañar proteínas y lípidos de las membranas plasmáticas y mitocondrial. La membrana plasmática es particularmente vulnerable al estrés oxidativo, ya que es muy rica en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son muy sensibles a la oxidación y a otras modificaciones químicas y estructurales (Jones et al 1979).

Las ROS modifican la membrana plasmática del espermatozoide alterando su fluidez. Esto da lugar a una pérdida de la motilidad y afecta los eventos de fusión de la membrana, como la reacción acrosómica y la fusión del espermatozoide-ovocito

(Aitken et al., 1989). También se ha demostrado que las ROS causan daño en el ADN espermático, tanto nuclear como mitocondrial (Sawyer et al., 2003).

Los principales tipos de lesiones producidas en el ADN espermático son:

- ✓ Roturas de ADN en cadena sencilla o de cadena doble,
- ✓ Pérdida de una base,
- ✓ Modificación química de las bases, por ejemplo oxidación o alquilación,
- ✓ Entrecruzamiento del ADN entre o intra-cadena
- ✓ Entrecruzamiento ADN-proteína (Gharagozloo & Aitken 2011).

Una de las modificaciones del ADN más frecuentes es la hidroxilación de la guanina en el carbono 8 para dar lugar a un 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina (8-oxoguanina o 8-oxoG). , la cual es considerada como marcador de daño oxidativo (Breen & Murphy., 1995) (Kasai. 1997).

Las principales fuentes de ROS en el plasma seminal son los leucocitos (Aitken et al., 1994) (Aitken & Baker., 1995) y los espermatozoides inmaduros (Gómez et al. 1996). Las muestras de semen pueden estar contaminadas con leucocitos principalmente neutrófilos y macrófagos. Los neutrófilos activados generan grandes cantidades de ROS, particularmente el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (Gharagozloo & Aitken 2011). Por otro lado, los espermatozoides inmaduros que contienen gotas citoplasmáticas, como resultado de un fallo en la espermiogénesis, también generan grandes cantidades de ROS (Gómez et al., 1996).

Numerosos autores han publicado que existe un aumento significativo en la actividad de las ROS en los espermatozoides humanos en varios tipos de infertilidad (Aitken & Clarkson., 1987), (Aitken et al., 1989), (D'Agata et al., 1990), (Aitken et al., 1991), (Aitken et al., 1992), (Iwasaki & Ganon., 1992), (Zini et al., 1993), (de Lamirande & Gagnon., 1995), (Sharma & Agarwal., 1996), (Kodama et al., 1997), (Shen et al., 1999). Y es universalmente aceptado que el exceso de ROS contribuye significativamente al daño en el ADN espermático y a la peroxidación lipídica

(Alvarez et al., 1987), (Hughes et al 1996), (Aitken & De lullis., 2010), (Aitken et al., 2010), (Gharagozloo & Aitken 2011).

### Apoptosis

La apoptosis es un modo de muerte celular programada basada en un mecanismo genético que induce una serie de alteraciones celulares, morfológicas y bioquímicas, que llevan a la muerte celular (Nagata 1997).

La tercera hipótesis acerca del origen del daño en el ADN de los espermatozoides humanos sugiere que este daño es el resultado de un mecanismo apoptótico que se inicia en la espermiogénesis pero que no se puede completar debido a que la extrema remodelación de la cromatina que sufren las células germinales durante la espermiogenesis, elimina la maquinaria intracelular necesaria para llevar a cabo la muerte celular (Sakkas et al., 2002).

El hecho de que los espermatozoides sean células transcripcional y traduccionalmente inactivas significa que no pueden llevar a cabo un mecanismo apoptótico convencional. Sin embargo, hay numerosas publicaciones que demuestran que estas células pueden exhibir muchas de las características de apoptosis, incluyendo activación de las caspasas 1, 3, 8 y 9; externalización de fosfatidil serina y generación mitocondrial de ROS (Barroso et al., 2000), (Paasch et al., 2004), (Grunewald et al., 2009).

Esta teoría ha sido bastante controvertida ya que, aunque la presencia de estos marcadores apoptóticos en espermatozoides maduros, particularmente frecuentes en hombres infértiles, se asocia con una pérdida de la función del espermatozoide (Zhang et al., 2008), no parece correlacionarse con la presencia de fragmentación de ADN (Muratoro et al., 2000), (Sakkas et al., 2002), (Mc Vicar et al., 2004), (Moustafa et al., 2004), (Paasch et al., 2004).

Estas tres hipótesis que se exponen para explicar el origen del daño en el ADN espermático no tienen por qué ser excluyentes y cada uno de estos mecanismos

podría contribuir en mayor o menor medida al daño del ADN observado en muestras espermáticas.

Es así que la exposición a factores genéticos, ambientales, ocupacionales, hábitos tóxicos y ciertas patologías como el varicocele se asocian también con un mayor daño en el ADN espermático.

Estudios demuestran que la selección natural de espermatozoides mediante la capacitación espermática en varones fumadores está comprometida, lo que puede resultar finalmente en embriones de peor calidad y tasas de embarazo menores (Viloria 2007).

Dentro de las infecciones de transmisión sexual, *Chlamydia trachomatis* se considera la infección más frecuente en el mundo asociada a diversos efectos sobre el proceso reproductivo (Vincelette, 1999). La Organización mundial de la Salud (OMS) estima que su incidencia es de 50 millones de caso por año (WHO, 2010).

Existen evidencias contradictorias acerca de la influencia de *Chlamydia trachomatis* en la calidad espermática. Un gran número de estudios en vivo han sugerido que esta infección no se asocia con una alteración en los parámetros seminales (Weidner., 1996) (Habermann & Krause., 1999) (Vigil., 2002) (Barbeyrac., 2006) (Gunyeli., 2011). Otros, sin embargo, encuentran una correlación significativa entre la infección por *Chlamydia* y un descenso en la motilidad (Cengiz., 1997) (Gdoura, 2001) (Veznik., 2002) (Bezold., 2007) y una reducción significativa de la concentración y la morfología (Cengiz., 1997) (Veznik., 2002).

En cambio los estudios en vitro ofrecen datos más esclarecedores demostrando que la infección por *Chlamydia* produce un descenso significativo en el número de espermatozoides móviles y da lugar a apoptosis (Hosseinzadeh., 2001) (Satta., 2006) (Eley., 2005).

El varicocele, por su parte, se considera la causa más común y corregible de infertilidad masculina, en el cual se ha implicado que el estrés oxidativo es uno de los agentes causales de la disfunción espermática en estos pacientes (Martínez., 2004). En esta situación, la producción de ROS puede sobrepasar la capacidad

antioxidante total y originar estrés oxidativo, (Aitken., 1989) (Alkan., 2001) que conduce a una función espermática defectuosa y disminución de la movilidad (Aitken., 1987) (Alvarez, 1987) (Allamameni SS., 2004).

Se han encontrado concentraciones de ROS más elevadas en pacientes fértiles o infértiles con varicocele que en aquellos sin varicocele (Weese., 1993). Un ROS que se incrementa notablemente en pacientes afectados por varicocele es óxido nítrico. En condiciones normales, el óxido nítrico regula la motilidad de los espermatozoides, pero en altas concentraciones se torna altamente tóxico. En pacientes con varicocele se han encontrado niveles de óxido nítrico 25 veces mayores en la vena espermática comprometida que en sangre periférica (Martínez., 2004).

En cuanto a sustancias espermatóxicas y protectoras como los antioxidantes, un estudio llevado a cabo por Mostafa y col. demostró una disminución de sustancias espermatóxicas: malondialdehído (MDA), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y óxido nítrico; y un incremento de los niveles de antioxidantes: vitaminas C y E, catalasa, albumina superóxido dismutasa, entre los 3 y 6 meses posteriores a la cura operatoria del varicocele (Mostafa., 2001).

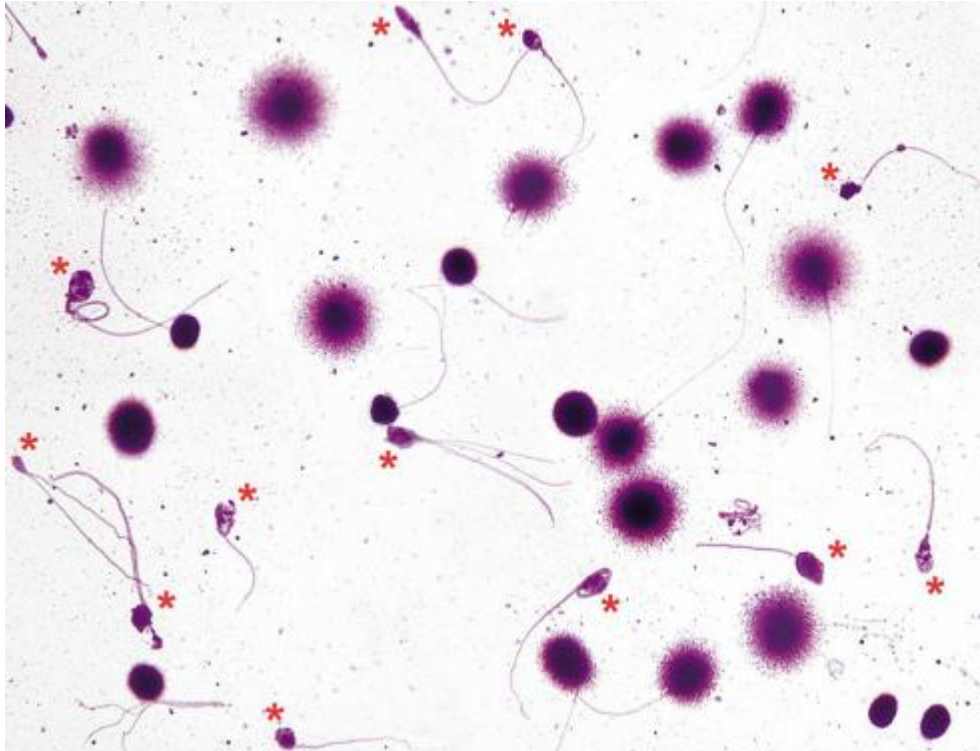


Figura I. Ensayo SCD en un individuo con varicocele. La frecuencia de células sin halo y degradadas es alto, reflejando un grado elevado de daño nuclear.

## TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DEL DAÑO NUCLEAR DEL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO DEL ESPERMATOZOIDE

### ENSAYO COMETA

Este ensayo es una adaptación de la electroforesis de DNA desnudo, comúnmente utilizado en biología molecular, al campo de la biología celular. La idea es que el DNA de un núcleo desproteinizado que contenga roturas en sus cadenas de DNA, estará más libre para ser movilizado hacia el polo positivo, cuando este se someta a un campo eléctrico. La metodología consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga reductor de los grupos sulfhidrilo que se encuentran en las protaminas del espermatozoide. Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sustancias fluorescentes del tipo DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole),



IP (Ioduro de Propidio) o SYBR-GREEN (Synergy Brand). De esta forma el ADN fragmentado se desplaza generando una imagen similar a un cometa. Aquellos espermatozoides con su DNA integro no generan o solo producen imágenes de discretas colas de cometa, mientras que aquellos núcleos que tienen su ADN dañado muestran un claro desplazamiento de los múltiples fragmentos de DNA.

El mayor inconveniente de este Ensayo es que requiere un material de uso no común en un laboratorio de andrología, como son fuentes de electroforesis para ADN y para la interpretación de los resultados se requiere un observador con experiencia o bien un software específico para que la prueba tenga cierta objetividad.



Figura II. Visualización de la integridad del DNA mediante el ensayo de cometas. Los espermatozoides que representan ADN fragmentado (parte inferior de la figura) muestran un claro desplazamiento de los fragmentos de DNA al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico. Este no se aprecia en los núcleos que mantienen el DNA integro (parte superior de la figura).

## ENSAYO DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA

El ensayo de la estructura de la cromatina espermática (sperm chromatin structure assay, SCSA) es una técnica fluorocitométrica que identifica espermatozoides con defectos en el empaquetamiento de la cromatina, utilizando la tinción de naranja de acridina, la cual es fluorescente y permeable en la célula, e interacciona con el ácido desoxiribonucleico por intercalación o atracción electrostática.

Las células son analizadas utilizando un citómetro de flujo equipado con un láser de argón, donde se cuentan un total de 5000 episodios.

En estas condiciones, cuando se excita con una luz de 488 nm, el naranja de acridina intercalado con ADN de doble cadena (ADN intacto) emite fluorescencia verde, mientras que, en el caso de la cadena simple (ADN dañado), la fluorescencia emitida es roja. Por tanto, el daño en el ADN puede ser cuantificado por las proporciones entre las medidas del citómetro de flujo de los colores rojo y verde (como control se utilizan muestras de semen de donante).

Para el análisis de los datos se utiliza un software específico del citómetro. Las ventanas en el ordenador se utilizan para determinar la proporción de espermatozoides con niveles elevados de fluorescencia roja y verde.

En la citometría de flujo, los parámetros evaluados son:

- ✓ El nivel de desnaturalización del ADN, que se expresa mediante el índice de fragmentación del ADN (DNA fragmentation index, DFI), que es el cociente entre la fluorescencia verde y la total (verde + roja) en cada espermatozoide de la muestra. La mayoría de los espermatozoides forman parte de una población con características concretas. Las células con mayor proporción de rojo representan la población anormal con DFI alterado.
- ✓ Espermatozoides con cromatina inmadura, que se determina mediante HDS (high DNA stainability): indica la presencia de células con cromatina inmadura o anormalmente condensada, es decir, aquellas con una fluorescencia verde superior a la normal.

El SCSA ha sido definido como el método de referencia en el estudio de la integridad del ADN. Sin embargo, es una técnica muy costosa, que requiere mucho tiempo, además de un complejo equipamiento que no está disponible en la mayoría de los laboratorios de andrología.

### ENSAYO TUNEL

Está basado en la unión de nucleótidos marcados con fluorescencia mediante el uso de una transferasa terminal, en los lugares donde se encuentre una rotura en el ADN. El porcentaje de espermatozoides con fragmentación del DNA se determina por observación directa usando un microscopio de epifluorescencia o un citómetro de flujo. El porcentaje de espermatozoides marcados con fluorescencia verde respecto al total representa aquellos con resultado positivo para TUNEL.

El TUNEL ha sido uno de los principales métodos para detectar la muerte celular programada (apoptosis). Sin embargo, durante años, ha habido un gran debate acerca de su precisión, debido a los problemas ocasionados con la técnica original, que daba lugar a células necróticas que eran calificadas inapropiadamente como apoptóticas. Posteriormente, el método fue mejorado y, si se realiza correctamente, identificaría únicamente células en la última fase de apoptosis.

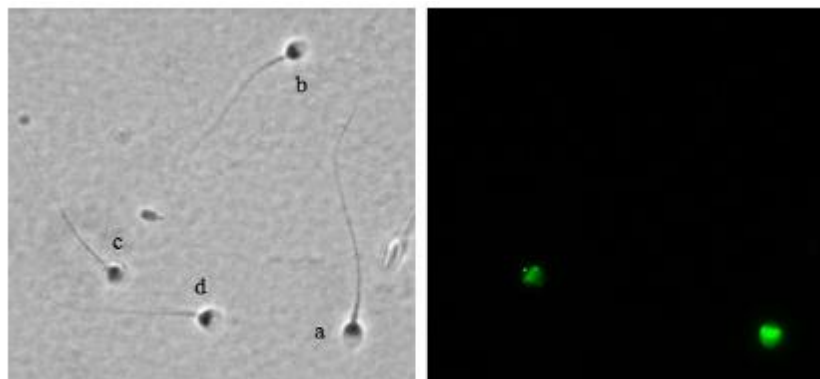


Figura III. Microfotografías representativas de la evaluación simultánea de la morfología de los espermatozoides normales y con fragmentación del ADN tras la realización de swim up. A la derecha fluorescencia TUNEL. (a) Espermatozoide

normal con fragmentación del ADN; (b) Espermatozoide normal sin fragmentación del ADN; (c) espermatozoide morfológicamente anormal con fragmentación de ADN; y (d) espermatozoide morfológicamente anormal sin fragmentación del ADN.

### ENSAYO DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA

El análisis de la dispersión de la cromatina espermática (Sperm chromatin dispersion assay, SCD) mejorado (Halosperm) es otra alternativa en la investigación de la fragmentación del DNA en los espermatozoides.

Está basado en la capacidad del ADN integro de expandirse “como ovillo de lana” en determinadas condiciones bioquímicas donde se eliminan las proteínas que le confieren su estructura.

Los espermatozoides se tiñen con colorantes empleados en el análisis de la morfología (por ejemplo panóptico rápido) y se observan con el microscopio de campo claro un mínimo de 500 espermatozoides que se clasifican en cinco categorías:

- ✓ Halo grande: el tamaño del halo es semejante o mayor que el core.
- ✓ Halo mediano: el tamaño del halo entre el grande y el pequeño.
- ✓ Halo pequeño: su tamaño es igual o menor a un tercio del diámetro menor del core.
- ✓ Células sin halo.
- ✓ Degradadas.

El SCD es un procedimiento simple y resulta una prueba fiable y de bajo costo que determina la susceptibilidad del ADN del espermatozoide a la desnaturalización ácida.

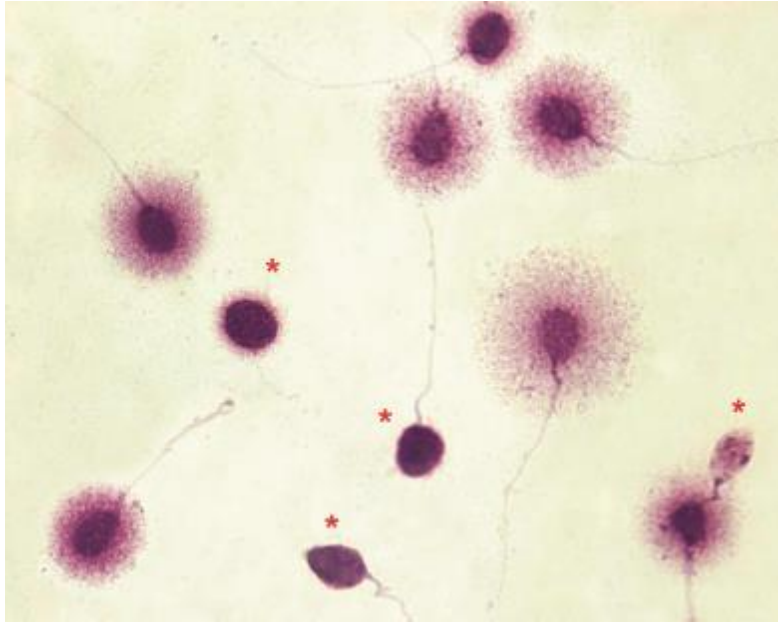


Figura IV. SCD: Núcleos con halo pequeño, sin halo y degradados contienen fragmentación de ADN espermático.

A pesar de la controversia existente, cada uno de los autores implicados en el desarrollo de estas tecnologías ha validado de diferente manera que las mediciones que realizan son las adecuadas.

En un interesante trabajo, Crohan compara el SCSA, SCD y el TUNEL, concluyendo que cualquiera de estas técnicas presenta resultados similares. En casi 70 varones, tomando como referencia el SCSA, determinó la existencia de una fuerte correlación con las demás técnicas ( $p=0.001$ ).

Aun así, la controversia está servida y los diferentes autores mantienen puntos de vista opuestos respecto a la validez de otras técnicas distintas a las propias.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infertilidad es reconocida como un problema de salud pública a nivel mundial por la Organización Mundial de la Salud. Se estima que puede afectar a 1 de cada 6 a 10 parejas, por lo que estas parejas necesitaran ayuda médica para resolver su paternidad la cual, no se logra en forma espontánea.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) han permitido en las dos últimas décadas a miles de parejas infértiles tener hijos, actualmente los reportes bibliográficos muestran que las TRA son responsables del 1% de todos los nacimientos y 18 % de nacimientos múltiples en los Estados Unidos.

Específicamente para el estudio de la infertilidad masculina relacionado con la calidad del semen, la Organización Mundial de la Salud, ha establecido una serie de parámetros que se analizan en forma rutinaria en el laboratorio básico de Andrología. Sin embargo, se estima que aproximadamente un 15 % de los varones estériles presentan un espermograma normal.

Es por esto que en las últimas décadas ha aumentado el interés en el estudio de la calidad del ADN de los espermatozoides ya que la capacidad de fertilización del espermatozoide no solo depende de la competencia funcional de este sino también de la integridad del ADN espermático.

Una amplia serie de estudios han determinado la correlación entre el daño del ADN espermático y el impacto negativo con la fertilidad, con el desarrollo embrionario y con una baja tasa de formación de blastocistos y de embarazo tras fertilización in vitro (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), en tanto que otros no han hallado dicha relación.

**Por ello la pregunta de investigación fue:**

**Existe diferencia en las tasas de embarazo según el porcentaje de fragmentación del ADN espermático de acuerdo a la Técnica| de Reproducción Asistida utilizada?**

## JUSTIFICACIÓN

### **MAGNITUD:**

Para la fertilidad normal, tanto el hombre como la mujer deben ser capaces de proporcionar gametos de buena calidad. Con frecuencia el hombre es relegado en el estudio de la pareja fértil y se tiende a olvidar que este factor guarda una estrecha interdependencia con los demás, y que la disminución de la capacidad reproductiva en un hombre se manifestara o no de acuerdo con el potencial de fertilidad de su compañera o viceversa.

Diferentes investigaciones señalan que en el mundo la calidad y las cuentas espermáticas han disminuido en los últimos 50 años probablemente a consecuencia de la contaminación industrial y a otros factores ambientales.

En nuestro medio existen limitantes para conocer con precisión el número de parejas afectadas por infertilidad, es así como las TRA surgen como la solución para estas parejas que buscan paternidad.

### **TRASCENDENCIA:**

Actualmente el esfuerzo mundial está enfocándose en aumentar las tasas de éxitos de las TRA. Existen un gran número de variables que interactúan en las mismas y que tienen que estar en equilibrio para lograr el éxito de estos procedimientos.

El espermograma no nos brinda una real precisión de la predicción del potencial fecundante del espermatozoide y no siempre es capaz de explicar la causa de infertilidad masculina, es por ello que diversos autores han recomendado la introducción del análisis de la fragmentación del ADN espermático como prueba de rutina y complementaria en el análisis del semen.

La trascendencia de este estudio estriba en que fue diseñado para determinar si existen diferencias significativas en los resultados reproductivos de acuerdo al porcentaje de fragmentación del ADN espermático.

**FACTILIDAD:**

Durante los últimos años el Instituto de Ciencias en Reproducción Humana VIDA en el Hospital Puerta de Hierro ha realizado un registro hospitalario de logros de fertilización, por lo cual este estudio conto con la información requerida para la realización de los objetivos de la investigación.

**VIABILIDAD:**

Para la realización de este protocolo de investigación se contó con el conocimiento científico del asesor así como la experiencia y cooperación del personal del Instituto que intervino en la evaluación de la fragmentación del ADN espermático y de las técnicas de TRA.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la tasa de embarazo con el uso de diferentes técnicas de reproducción asistida (IIU, FIV e ICSI) en pacientes con diferentes porcentajes de fragmentación del ADN espermático.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Identificar las causas de infertilidad en el grupo de estudio.
- ✓ Determinar si la fragmentación del ADN espermático se encuentra aumentada en situaciones patológicas como el varicocele o frente a la existencia de ciertos hábitos tóxicos.
- ✓ Estimar la relación de las variables seminales con el porcentaje de fragmentación del ADN espermático.

## HIPÓTESIS

H1=

“Existe diferencia significativa en la tasa de embarazo en pacientes con incremento en la fragmentación del DNA espermático según la TRA utilizada”

H0=

“No existe diferencia significativa en la tasa de embarazo en pacientes con incremento en la fragmentación del DNA espermático según la TRA utilizada”

## MATERIAL Y METODOS

### TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo, retrospectivo de corte transversal.

### UNIVERSO DE ESTUDIO

Se revisaron los expedientes clínicos de todos los pacientes a quienes se les solicitó espermatobioscopias (EBD) con fragmentación del ADN espermático durante el periodo comprendido de enero de 2012 a diciembre de 2013.

### CRITERIOS DE SELECCIÓN

#### **Criterios de Inclusión**

1. Parejas con infertilidad por factor masculino atendidas en el Instituto VIDA en el Hospital Puerta de Hierro en el lapso comprendido de enero de 2012 a diciembre de 2013
2. Pacientes a quienes se les realizó EBD con fragmentación del ADN espermático.
3. Todas las parejas que fueron sometidas a TRA (IIU, FIV e ICSI).
4. Todas las parejas con registro de prueba de embarazo.
5. Todas las pacientes con registros de embarazo clínico o aborto.

#### **Criterios de no inclusión**

1. Pacientes con expedientes incompletos.
2. Pacientes que no mostraron la continuidad del control de la TRA.

#### **Criterios de Exclusión**

1. Pacientes a los cuales se les realizó EBD sin estudiar la fragmentación del ADN espermático.

2. Pacientes con azoospermia.
3. Pacientes con atrofia testicular.
4. Pacientes con criptorquidia.
5. Pacientes con antecedentes de quimioterapia y radioterapia.

## **TAMAÑO DE LA MUESTRA**

No probabilística consecutiva, muestreo por conveniencia.

## **TÉCNICA DE RECOLECCION DE LA INFORMACIÓN**

Se revisaron los expedientes clínicos de todos los pacientes quienes se les solicito una espermatobioscopia con fragmentación del ADN espermático en el periodo comprendido de enero de 2012 a diciembre de 2013.

Se analizaron un total de 60 parejas que con diferente porcentaje de fragmentación de ADN espermático se les realizo posteriormente alguna Técnica de Reproducción Asistida (TRA), ya sea Inseminación Intrauterina (IIU), Fertilización in Vitro (FIV) e Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

Las muestras fueron obtenidas por masturbación, luego de 3 a 5 días de abstinencia sexual y se recogieron en recipientes estériles.

El análisis de los diferentes parámetros seminales se efectuó de acuerdo a los valores establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2010.

Se utilizó el test de Halosperm para evaluar la fragmentación del ADN espermático estableciendo como punto de corte 15 %.

## **DEFINICIÓN DE VARIABLES**

### **VARIABLE INDEPENDIENTE**

Fragmentación del ADN espermático: la cromatina espermática es una estructura compacta que consiste en el ADN y nucleoproteínas heterogéneas que protegen la integridad genética y facilitan el transporte del genoma paterno.

La fragmentación del ADN espermático puede ser inducida por apoptosis durante el proceso de espermatogénesis, en el epitelio de los túbulos seminíferos, por roturas en las cadenas de ADN producidas durante la remodelación de la cromatina espermática en la espermiogénesis, por las especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el transporte del espermatozoide de los túbulos seminíferos al epidídimo, por la inducción de caspasas endógenas y endonucleasas y tóxicos ambientales.

### VARIABLE DEPENDIENTE

- ✓ Tasa de embarazo clínico: presencia de saco gestacional con LCF positivos a las 7 semanas de embarazo.

### VARIABLES INTERVINIENTES

- 1) Edad.
- 2) TRA: Inseminación Intrauterina, FIV e ICSI.
- 3) EBD.
- 4) Hábitos tóxicos.
- 5) Varicocele.

VARIABLE	DEFINICION	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	MEDICION ESTADISTICA
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento de la realización de este estudio	Cuantitativa	Menor de 20 años  30 a 35 años  Mayor de 36 años	X, DE, IC  Medidas de tendencia central y dispersión
TRA	Técnicas mediante las cuales se manipulan las gametas femenina (óvulos) y	Cualitativa	Cualitativa	Proporciones

	masculina (espermatozoides) con el objeto de favorecer el embarazo.			
IFDNA		Cuantitativa	<15% ≥15%	Medidas de tendencia central y dispersión
EBD	Análisis funcional del semen	Cualitativa	Teratozoospermia Normozoospermia Oligoastenoteratozoospermia Astenoatozoospermia	Proporciones
Hábitos tóxicos		Cualitativa	Tabaco-Alcohol Alcohol Tabaco Drogas	Proporciones
Varicocele			Si No	Proporciones
Prueba de Embarazo		Cualitativa	Positiva Negativa	Proporciones

## ESTE ESTUDIO SE REALIZO

En el Instituto de Ciencias de la Reproducción Humana VIDA Guadalajara, con sede en el Centro Medico Hospital Puerta de Hierro.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue hecho mediante el software SPSS v21.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) para Macintosh.

Las variables continuas fueron presentadas en frecuencias, media y DE, y analizadas mediante la T de Student, la diferencia entre grupos con chi cuadrada, la prueba exacta de Fisher y el análisis de varianza de un factor (ANOVA) según ameritaba el caso. Para variables categóricas fueron expresadas por proporciones analizadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Una  $P < 0.05$  fue considerada estadísticamente significativa.

## CONSIDERACIONES ETICAS

Este estudio de investigación se apegó a los principios emanados de la 18ª asamblea médica de Helsinki, Finlandia en 1964, de las modificaciones hechas por la propia asamblea en Tokio, Japón en 1975 y en el 2001 donde se contempló la investigación médica (Investigación Clínica). Acorde con la Ley General de Salud de México. Se manifiesta el respeto a la persona, la vida y la seguridad así como a todos los derechos de confidencialidad de quienes integraron la unidad de investigación. En ningún momento se revelaron en el estudio tanto nombres u otras características que pudieran permitir la identificación del paciente en específico. Se cumplió con las consideraciones de la norma de instituciones en materia de investigación científica realizando la investigación personal calificado del Hospital Puerta de Hierro.

## RECURSOS

**Recursos humanos:** Investigador y asesores

**Recursos materiales:**

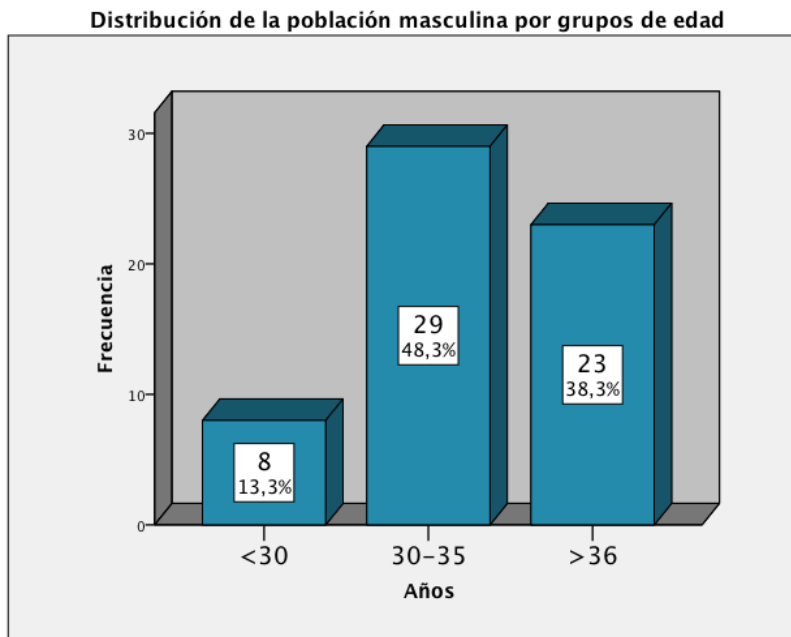
- ✓ Material de oficina: tablas de trabajo, hojas blancas, bolígrafos, lápices, carpetas, tinta, borradores, corrector.
- ✓ Fotocopiadora.
- ✓ Equipo de cómputo: hardware, software estadístico, impresora, tóner.
- ✓ Instrumento de concentración de datos.
- ✓ Medios informáticos: internet.

**Financiamiento:** El costo de este protocolo de investigación fue cubierto por el investigador y los recursos propios del hospital.

## RESULTADOS

Nuestra población estudiada fue de 60 hombres, cuya edad media fue de  $34.8 \pm 4.7$  años, la edad mínima fue de 26 años y la máxima de 50, a su vez clasificamos a nuestro grupo de estudio por grupos de edad, tal como se muestra en el gráfico 1.

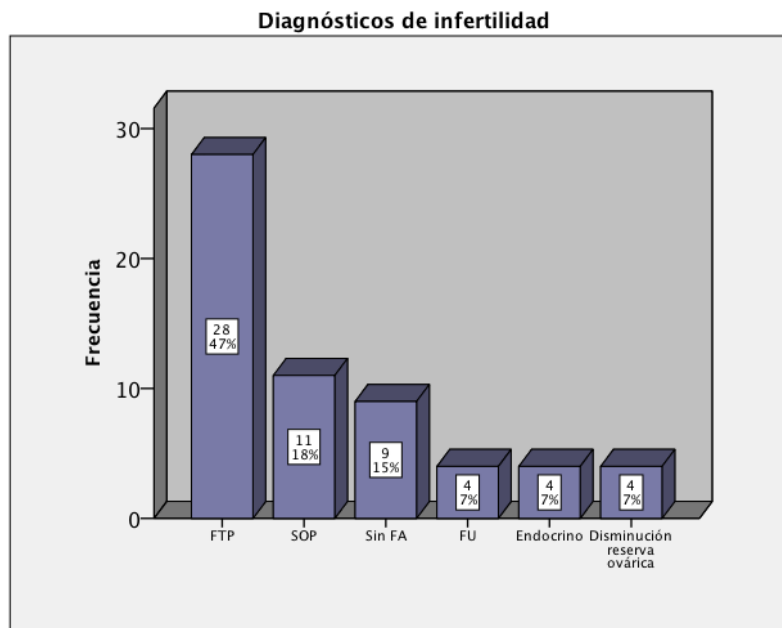
Gráfico 1.



Casi la mitad de las parejas de nuestra población afectada ( $n=28$ , 47%) tuvo el factor tuboperitoneal alterado, en casi una quinta parte ( $n=11$ , 18%) correspondió a la anovulación provocada por un síndrome de ovario poliquístico y en una sexta parte ( $n=9$ , 15%), sin factor asociado (gráfico 2).



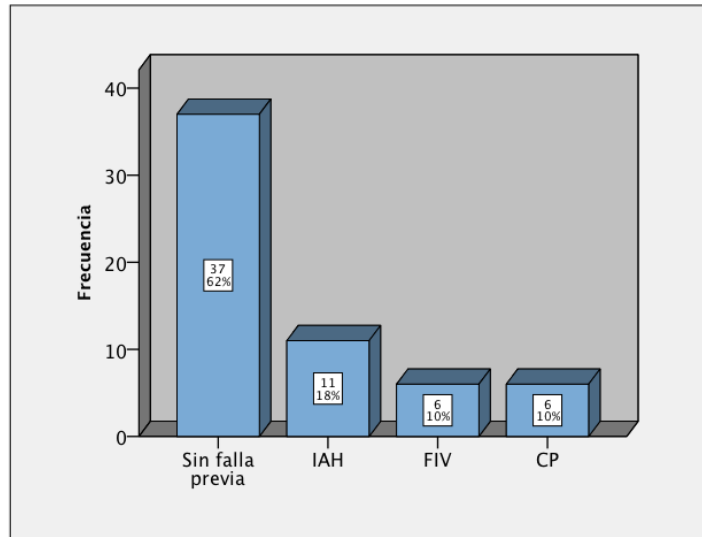
Gráfico 2.



FTP= factor tuboperitoneal; SOP= síndrome de ovario poliquístico; FA=factor asociado; FU= Factor uterino.

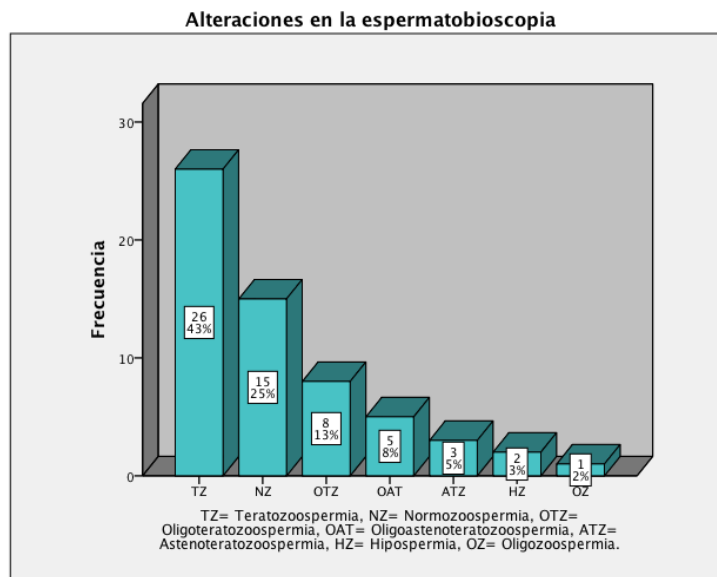
Como podemos observar, más del 60% de nuestro grupo de estudio no tuvo antecedente de un tratamiento de reproducción asistida previo, casi una quinta parte sí tuvo inseminaciones artificiales intrauterinas homólogas y en un 10% tanto FIV como CP (gráfico 3).

Gráfico 3.



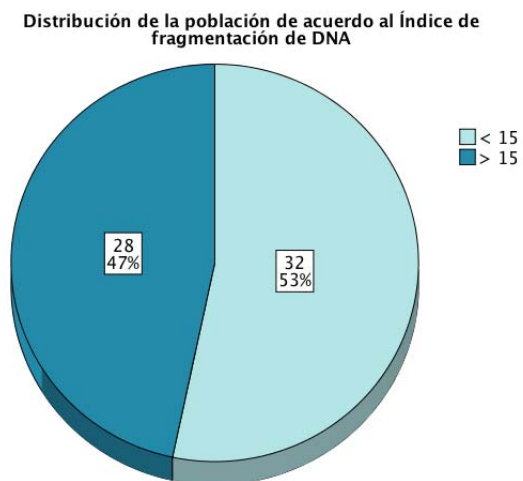
Es muy interesante resaltar que  $\frac{3}{4}$  partes de nuestro grupo de estudio tuvo una alteración en la espermatooscopia, siendo la más frecuente la teratozoospermia (n=26, 43%), la oligoteratozoospermia (n=8, 13%) y la tercera más común fue la oligoastenoteratozoospermia (n=5, 8%) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Alteraciones en la espermatooscopia directa



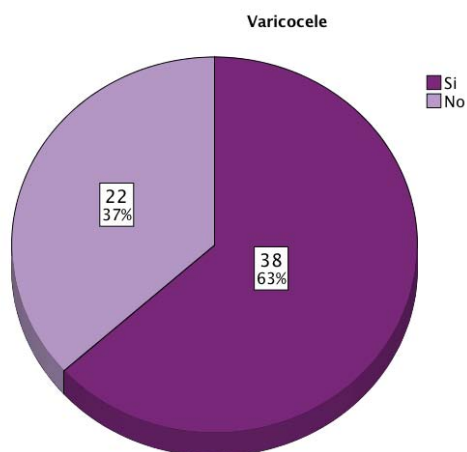
Encontramos que de los 60 pacientes poco más de la mitad presentaba una fragmentación del DNA mayor del 15 % (gráfico 5).

Gráfico 5.



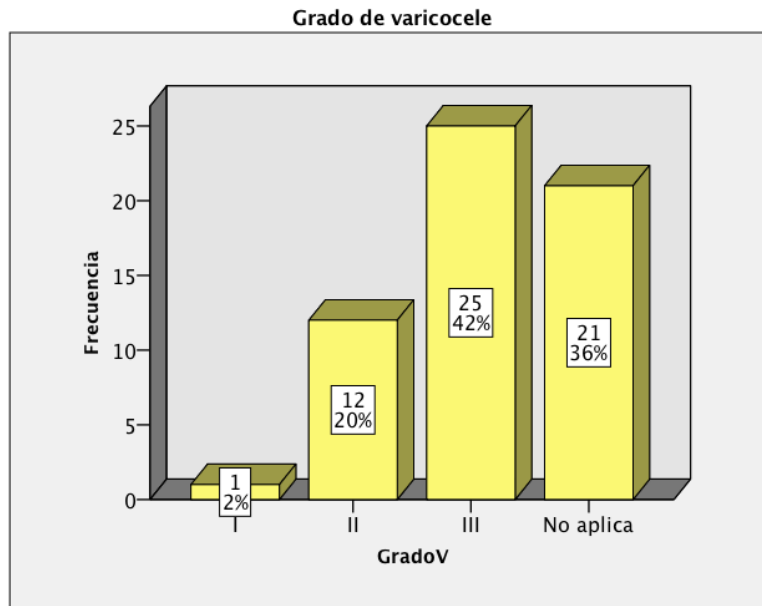
Fue interesante encontrar que nuestros pacientes presentaron varicocele en el 63% (n=38) (gráfico 6).

Gráfico 6.



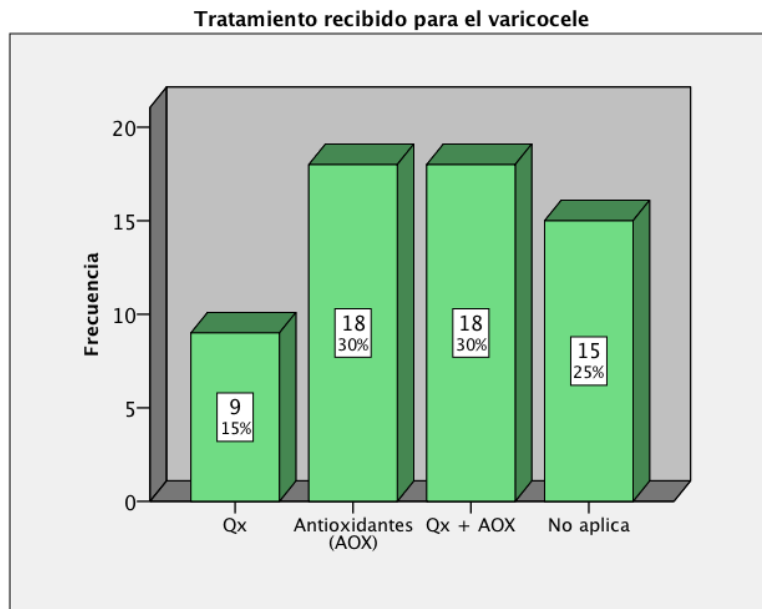
De estos pacientes con varicocele, el 42% (n=25) tuvo grado III, 20% (n=12) grado II y 1 paciente tuvo grado I. (gráfico 7).

Gráfico 7.



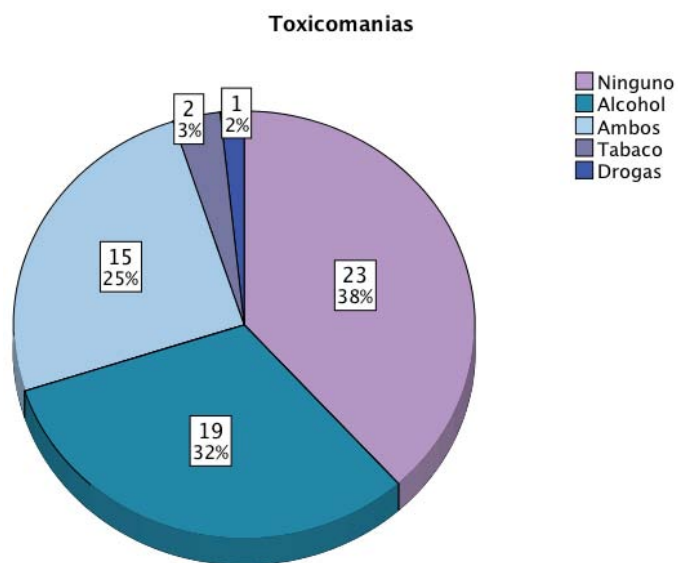
El 60% recibió tratamiento a base de antioxidantes solamente (n=18) y antioxidantes + varicocelectomía (n=18), el 15% recibió tratamiento exclusivo de forma quirúrgica (gráfico 8).

Gráfico 8



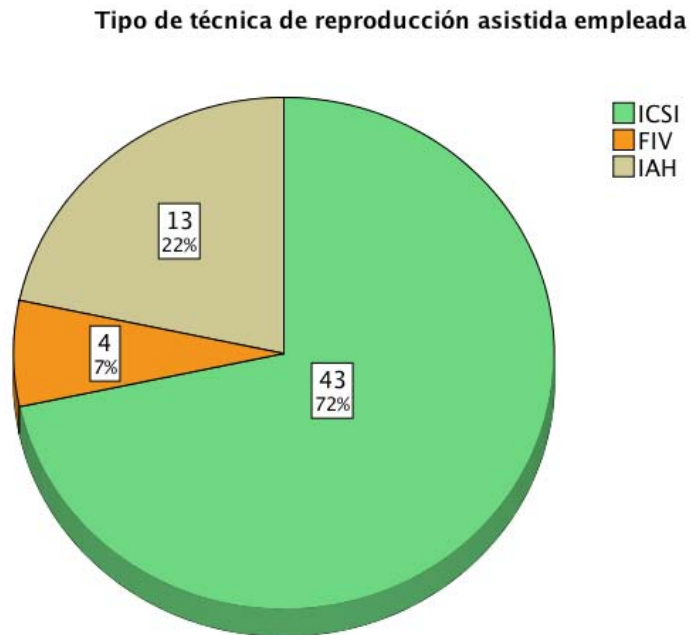
El 62% de nuestra población mantenía algún tipo de toxicomanías, la mas común fue el alcohol (n=19, 32%) seguida de alcohol + tabaco (n=15, 25%) (Gráfico 9).

Gráfico 9.



Nuestros pacientes recibieron un tipo de técnica de reproducción asistida desde baja hasta alta complejidad, la más empleada fue ICSI (n= 43, 72%), seguida de inseminación artificial autóloga (n=13, 22%) y FIV en un 7% (n=4). (Gráfico 10).

Gráfico 10



De acuerdo a la tabla, el IFDNA no se relaciona con la edad ( $p < 0.72$ ), es decir, la edad no determina el daño del DNA.

<b>Tabla 1. IFDNA y Edad*</b>			
<b>Grupos por edad</b>	<b>IFDNA</b>		<b>Total (%)</b>
	<b>&lt; 15 (%)</b>	<b>&gt; 15 (%)</b>	
< 30	4 (12.5)	4 (14.3)	8 (13.3)
31 – 35	17 (53.1)	12 (42.9)	29 (48.3)
> 36	11 (34.4)	12 (42.9)	23 (38.3)
<b>Total</b>	<b>32 (100)</b>	<b>28 (100)</b>	<b>60 (100)</b>

\* $p < 0.72$

La tabla 2 muestra que la fragmentación del DNA no determina una menor concentración de espermatozoides en el eyaculado.

**Tabla 2. IFDNA y concentración espermática\***

Concentración (millones/ml)	IFDNA		Total (%)
	< 15 (%)	> 15 (%)	
< 15	7 (21.9)	10 (35.7)	17 (28.3)
> 15	25 (78.1)	18 (64.3)	43 (71.7)
Total	32 (100)	28 (100)	60 (100)

\*p&lt;0.26

La tabla 3 indica que la fragmentación del ADN espermático no afecta el porcentaje de motilidad en el eyaculado.

**Tabla 3. IFDNA y motilidad espermática\***

Motilidad (%)	IFDNA		Total (%)
	< 15 (%)	> 15 (%)	
< 32	6 (18.8)	6 (21.4)	12 (20)
> 32	26 (81.3)	22 (78.6)	48 (80)
Total	32 (100)	28 (100)	60 (100)

\*p&lt;1.0

La tabla 4 demuestra que la fragmentación del ADN no afecta la morfología de los espermatozoides en nuestra población de estudio.

**Tabla 4. IFDNA y morfología\***

Morfología (%)	IFDNA		Total (%)
	< 15 (%)	> 15 (%)	
< 4	21 (65.6)	21 (75)	42 (70)
> 4	11 (34.4)	7 (25)	18 (30)
Total	32 (100)	28 (100)	60 (100)

\*p&lt;0.57

En nuestra población de estudio la fragmentación del ADN espermático no estuvo determinada por la presencia de varicocele.



**Tabla 5. IFDNA y presencia de varicocele\***

<b>Varicocele</b>	<b>IFDNA</b>		<b>Total (%)</b>
	<b>&lt; 15 (%)</b>	<b>&gt; 15 (%)</b>	
Si	23 (71.9)	15 (53.6)	38 (63.3)
No	9 (28.1)	13 (46.4)	22 (36.7)
Total	32 (100)	28 (100)	60 (100)

\*p&lt;0.18

Como podemos observar no existió relación entre la fragmentación de DNA y el embarazo.

**Tabla 6. IFDNA y prueba de embarazo\***

<b>Prueba de embarazo</b>	<b>IFDNA</b>		<b>Total (%)</b>
	<b>&lt; 15 (%)</b>	<b>&gt; 15 (%)</b>	
Positiva	12 (37.5)	8 (28.6)	20 (33.3)
Negativa	20 (62.5)	20 (71.4)	40 (66.7)
Total	32 (100)	28 (100)	60 (100)

\*p&lt;0.58

## DISCUSION

La fragmentación del ADN espermático es un parámetro que se incluyó en el estudio seminal hace relativamente poco tiempo y no se cuenta con valores de corte claramente establecidos para todas las técnicas. Tanto es así que en la última edición de la OMS poco se dedicó a este tema y no está incluido su determinación dentro de los ensayos de rutina recomendados (WHO, 2010).

Aitken y De Luliis (2010) recomiendan que el estudio del daño del ADN espermático de un paciente infértil debería ser considerado debido a que constituye un factor de riesgo que atenta sobre el normal desarrollo de los embriones y posiblemente también de su progenie. Sobre todo en aquellas parejas con dificultades para concebir que consultan con una historia de infertilidad de larga evolución o falla repetida de embarazo sin causa aparente.

Diferentes estudios se han desarrollado para evaluar el daño del ADN espermático y obtener información sobre la competencia espermática (Yilmaz S et al., 2010) (Fernández JL et al., 2003). Para la evaluación de la fragmentación del ADN espermático en nuestro laboratorio de Andrología se utiliza el Test de Halosperm (Fernández JL et al., 2005) (Fernández JL et al., 2005) que en los últimos años ha sido incorporado en los laboratorios.

Diferentes estudios confirman la evidencia de que varones infértiles presentarían pobre integridad del ADN espermático tal como se demostró en algunos estudios utilizando el test de Halosperm (Fernández JL et al., 2005), ensayo Cometa (Sheik N et al., 2008), TUNEL (Sergerie M et al., 2005) y correlacionando los test de Halosperm, SCSA y TUNEL (Chojan KR et al., 2006).

El aumento de daño a nivel del ADN espermático puede ser producido por diferentes causas como las encontradas principalmente por estrés oxidativo, por la condensación anormal de la cromatina del espermatozoide, por un proceso de

apoptosis y por la reducción de antioxidantes en el semen (Argawal A., et al 2003) (Henkel RR et al., 2010)

Se ha hallado relación entre la fragmentación de ADN y parámetros seminales anormales. La reducción de la concentración espermática en los valores altos de fragmentación puede indicar la presencia de un proceso apoptótico en las muestras de semen (Yilmaz S et al., 2010), así mismo estudios sugieren que los parámetros seminales (movilidad, morfología y vitalidad) disminuyen mientras aumenta el daño a nivel del ADN y presenta una correlación negativa entre la fragmentación debido a que los espermatozoides inmóviles, anormales y muertos producen un elevado nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los niveles altos de ROS en el plasma seminal aumentan el daño del ADN espermático (Saleh RA et al., 2003) (Aitken RJ et al., 2011) (Henkel RR et al, 2010)

El daño en el ADN, evaluado mediante SCD (Halosperm), muestra un incremento significativo de este parámetro en pacientes con oligoastenoteratozoospermia y en pacientes normozoospermicos frente a individuos fértiles. Sin embargo estos datos se contraponen con los obtenidos por Larson-Cook et al., que demostraron que el índice de fragmentación del ADN espermático no siempre estaba correlacionado con los parámetros seminales, solo un 30% de los varones con un índice de fragmentación superior al 27 % presentaban astenozoospermia y/o oligozoospermia. Sin embargo también es importante destacar que existen casos en donde, sin embargo, los parámetros seminales son normales y se presenta fragmentación de ADN.

En nuestro estudio no encontramos diferencia estadísticamente significativa en relación a la concentración, movilidad y morfología espermática.

Estableciendo como punto de corte el 15 % para el valor de la fragmentación del ADN espermático ninguno de los parámetros seminales mostró alteración en el grupo de pacientes con mayor porcentaje de fragmentación.

Nuestros hallazgos coinciden con el estudio de Tandara et al., los cuales no hallaron una correlación significativa entre la concentración y el índice de fragmentación del ADN espermático aunque en dicho estudio se estableció como punto de corte el 30 %.

La alteración más frecuente observada en la espermatobioscopia de nuestra población en estudio fue la teratozoospermia aunque a diferencia de otros estudios donde se evaluó también la correlación entre dicha alteración y la fragmentación del ADN espermático mediante Halosperm no obtuvimos iguales resultados ( $p < 0.57$ ).

Por otro lado es ampliamente conocida la disminución de la fertilidad con la edad de la mujer pero sin embargo todavía se desconoce si realmente la edad paterna afecta a la fertilidad en el mismo grado. Varios estudios han demostrado que no existe correlación entre la edad del varón y tasas de embarazo después de TRA (Erenpreiss J et al., 2006) (Aitken et al., 200), sin embargo otros han demostrado lo contrario (Sakkas D et al., 1999) (Evenson DP et al., 1999).

En nuestro estudio no hallamos diferencia estadísticamente significativa entre la edad de nuestra población en estudio y el índice de fragmentación del ADN; resultados que coinciden con los hallados por Benchaib et al., quienes no observaron correlación entre ambos parámetros mediante la técnica de TUNEL.

La técnica de SCD ha demostrado que los individuos con varicocele, presentan un nivel de fragmentación más alto que los fértiles. En hombres subfértiles con varicocele, se ha observado una liberación excesiva de óxido nítrico en las venas espermáticas dilatadas (Ozbek et al 2000).

En nuestro estudio si bien más de la mitad de la población en estudio (63%) presento algún grado de varicocele no hallamos diferencia estadísticamente significativa entre la presencia de varicocele y un aumento en la fragmentación del ADN espermático ( $p < 0.58$ ).

En cuanto a la relación que existe entre la fragmentación del ADN espermático y tasa de embarazo, los resultados son bastantes controvertidos. Con la técnica de

SCSA Larson et al., Larson-Cook et al., y Saleh et al., no obtuvieron ningún embarazo tras FIV/ICSI con un índice de fragmentación en semen en fresco superior al 27 %.

Virro et al., observaron que un índice de fragmentación superior al 30 % se correspondía con una baja tasa de formación de blastocistos y de embarazo, por el contrario Bungum et al., y Payne et al., si consiguieron embarazos tras FIV/ICSI con un índice de fragmentación > 27 %.

Bungum et al., compararon tasas de embarazo, tanto en ciclos de IAH como en ciclos de FIV/ICSI tomando como punto de corte un índice de fragmentación del 27 %. En dicho estudio observaron que en los ciclos de IAH las tasas de embarazo y de recién nacidos eran 4 veces inferiores cuando el índice de fragmentación era superior al 27 %, sin embargo en ciclos de FIV/ICSI estas tasas prácticamente no variaban. Sin embargo al desglosar los resultados observaron que en FIV la tasa de embarazo era la mitad que en ICSI atribuyendo esta diferencia a que en el ICSI el observador selecciona el espermatozoide de mejor movilidad y morfología y por lo tanto con mucho menos probabilidad de que presente mayor nivel de fragmentación.

Sin embargo estos datos contrastan con los observados por Duran et al., que en ciclos de IAH ninguna muestra con un índice de fragmentación superior al 12 % dio lugar a un embarazo, al igual que Benchaib et al., tampoco obtuvieron ningún embarazo en 54 ciclos de ICSI cuando la fragmentación era mayor al 20 %.

En nuestro estudio no hallamos diferencia estadísticamente significativa en relación a la prueba de embarazo y el índice de fragmentación del ADN espermático ( $p < 0.58$ ) ni para la población en estudio que presento un índice mayor al 15 % así como tampoco en relación a ninguna de las técnicas de reproducción asistida estudiadas (IAH, FIV e ICSI).

Nuestros resultados coinciden con los hallados por Seli et al., y Huang et al., los

cuales no apreciaron una relación entre la tasa de embarazo y la tasa de fragmentación del ADN espermático.

Un estudio que tomo igual punto de corte del 15 % fue el de Bechaib et al., quienes compararon los resultados obtenidos en FIV e ICSI pero ellos observaron que alteraciones en los parámetros seminales se relacionaban con un índice de fragmentación elevado con porcentaje de aborto significativamente superior en el grupo cuya fragmentación era superior al 15 % debido a que probablemente un elevado daño en el ADN del espermatozoide puede comprometer la viabilidad embrionaria y producir embarazo químico o aborto.

## CONCLUSIONES

A lo largo de las últimas décadas una amplia serie de estudios han tratado de establecer si la evaluación de la fragmentación del ADN espermático representa algún beneficio en el estudio del varón infértil.

Nuestros resultados deben ser cuidadosamente interpretados debido a que este estudio tiene ciertas limitaciones: la población fue obtenida en un centro de fertilidad de asistencia privada sin el uso de un grupo control sano, nuestra muestra es pequeña y fue determinada por los casos encontrados en un periodo corto de estudio.

Nuestros resultados revelan que la fragmentación del ADN espermático no es estadísticamente significativa en la tasa de embarazo, lo que contrasta con diversos estudios que han establecido que la fragmentación del ADN espermático tendría repercusiones desfavorables no solo en la tasa de embarazo sino también en las tasas de abortos.

Diversos autores han correlacionado los valores de fragmentación con los resultados de las diferentes técnicas de reproducción asistida para intentar establecer un punto de corte a partir del cual se pueda predecir los resultados de las mismas.

Hallarlo supondría aumentar notablemente las posibilidades de éxito, reduciendo el número de ciclos innecesarios y consiguiendo finalmente una mayor eficiencia en las técnicas de reproducción asistida lo que representaría no solo mayores tasas de embarazo, menores resultados adversos reduciendo tasas de embarazos bioquímicos y abortos sino también reduciendo notablemente el costo socio-económico.

## BIBLIOGRAFIA

- Schirren C. Practical Andrology. 1 st ed. Berlín: Verlag Bruder Hartman; 1972.
- Menkveld R, editor. The basic semen analysis. Oxon: Informa UK Ltd; c2007. 141p (Oehninger SC, Kruger TF, editors. Male infertility. Diagnosis and treatment; vol. 9).
- McDonough R. Editorial comment: has traditional sperm analysis lost its clinical relevance? *Fertil Steril* 1997; 67 (3): 585.
- Nallella KP., Sharma RK., Aziz N., Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Practitioner*. 2007; 251 (1690): 8-10, 12, 15-7.
- Haidl G., Allam JP., Schuppe HC. Chronic epididimitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia*. 2008; 40 (2): 92-6.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 1st ed. Singapore: Press Concern; 1980.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm- cervical Mucus Interaction. 2nd ed. Cambridge University Press; 1987.
- WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5ta Edition 2010.
- Jequier AM. Semen analysis: a new manual and its applications to the understanding of semen and its pathology. *Asian J Androl*. 2010; 12 (1):7-10.
- Handelsman DJ., Cooper TG. Foreword to Semen Analysis in 21 st Century Medicine special issue in Asian Journal of Andrology. *Asian J Androlol*. 2010; 12 (1): 11-3.
- Larson-Cook KL., Brannian JD., Hansen KA., Kasperson KM., Aamold ET., Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003; 80: 895-902.



Lewis SE., Agbaje I., Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med.* 2008; 87 (1): 93-100.

Muriel L., Garrido N., Fernandez JL., Remohí J., Pellicer A., de los Santos MJ., et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2006; 85 (2): 371-83.

Fraser L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Pol J Vet Sci* 2004; 7 (4): 311-21.

Brugnon F., Van Assche E., Verheyen G., Sion B., Boucher D., Pouly JL., et al. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Human Reprod* 2006; 21 (3): 685-93.

Lin MH., Kuo-Kuang Lee R., Li SH., Lu CH., Sun FJ., Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008; 90 (2): 352-9.

Collins JA., Barnhart KT., Schlegel PN. Do sperm DNA integrity test predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008; 89(4): 823-31.

Benchaib M., Lornarge J., Mazoyer C., Lejeune H., Salle B., Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007; 87 (1): 93-100.

Wyrobek AJ., Eskenazi B., Young S., Amheim N., Tiemman-Boege I., Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103 (25): 9601-6.

Spano M., Seli E., Bizarro D., Manicardi GC., Sakkas D. The significance of sperm DNA strand break on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005; 17 (3): 255-60.

Acharyya S., Kanjilal S., Bhattacharyya AK. Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian J Exp. Biol.* 2005; 43 (11): 1016-22.

Qiu Y., Wang L., Zhang L. Yang D., Zhang A., Yu J. Analysis of sperm chromosomal abnormalities and sperm DNA fragmentation in infertile males. *Zhonghua Yi Xue Chuan Xue Za Zhi.* 2008; 25 (6): 681-5. Chinese

Perrin A., Caer E., Oliver- Bonet M., Navarro J., Benet J., Amice V et al. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril* 2009; 92 (2): 583-9.

Zini A., Boman JM., Belzile E., Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2008; 23 (12): 2663-8.

French DB., Desai NR., Agarwal A. Varicocele repair: does it still have a role in infertility treatment? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20 (10): 269-74.

Aitken RJ. Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. *Asian J Androl* 2010; 12 (1): 99-103.

Agarwal A., Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 2005; 84 (4): 850-3.

Lopes S., Sun JG., Jurisicova A., Meriano J., Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 528-32

Aitken RJ., Gordon E., Harkiss D., Twigg JP., Milne P., Jennings Z et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1037-46.

Wells D., Bermudez MG., Steuerwald N., Thornhill AR., Walker DL., Malter H et al. Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Hum Reprod* 2005; 20:1339-

48

Gasca S., Pellestor F., Assou S., Loup V., Anahory T., Dechaud H et al. Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 175-83.

Wyrobek AJ., Eskenazi B., Young S., Arnheim N., Temann-Boege I., Jabs EW et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm, *PNAS* 2006; 103:9601-6.

Belloc S., Cohen-Bacrie P., Benkhalifa M., Cohen-Bacrie M., De MJ., Hazout A et al. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination, *Reprod Biomed Online* 2008; 17:392-7.

Tesarick J., Greco E., Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reprod* 2004; 19:611-5

Borini A., Tarozzi N., Bizzarro D., Bonu MA., Fava L., Flamigni C et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development after in vitro in ART. *Human Reprod* 2006; 2: 2876-81

Seli E., Gardner DK., Schoolcraft WB., Moffatt O., Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 82: 378-83.

Zini A., Dohle G. Are varicoceles associated with increased deoxyribonucleic acid fragmentation? *Fertil Steril* 2011; 96: 1283-87.

Dar S., Grover S., Moskovtsev S., Swanson S, Baratz A., Librach C. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with a markedly high DNA fragmentation index (> 50 %). *Fertil Steril* 2013; 100: 75-80.

Zhao M., Zhang Q., Wang Y., Li Y. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2014; 1-8.

Collins J., Barnhart K., Schelegel P. Do sperm DNA integrity pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008; 89: 823-31.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril*; 99: 673-77.

Burrello N., Arcidiacono G., Vicari E., Asero P., Di BD., De PA et al. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-asthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Human Reprod* 2004; 19: 2298-302.

Evenson D., Kasperson K., Wikon RL. Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 93-113.

Bungum M., Humaidan P., Spano M., Jepson K., Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reprod* 2004; 19:1401-8

Griffin DK., Abruzzo MA., Millie EA., Sheenan LA., Feingold E., Sherman SL et al. Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect on increasing paternal age. *Human Mol Genet* 1995; 4: 2227-32.

Morris ID., Iltot S., Dixon L., Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reprod* 2002; 17: 990-8.

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

Twigg JP., Irvine S., Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14: 2279-85.

Aitken RJ., Gordon E., Harkis D., Twigg JP., Milne P., Jennings Z et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1037-46.

Gandini L., Lombardo F., Caruso F., Eleuteri P., Leter G et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Human Reprod* 2004; 19: 1409-17

Morales R., Lledo B., Ortiz J., Rodriguez-Arnedo D., Fabregat A, Bernabeu R. Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2007; 24: 305-313.

Smith R., Kaune H., Pardi D., Madariaga M., Morales I., Ríos R., et al. Aumento del daño en el ADN y estrés oxidativo en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia idiopática y antecedentes de criptoquidismo. *Rev Med Chile* 2007; 135:279-286.

Cortes- Gutiérrez El., Dávila- Rodríguez MI., López-Fernandez C., Fernandez JL., Gosalvez J. Evaluación del daño en el ADN espermático. *Actas Urol Esp* 2007; 31:120-131.

Lewis S., Agbaje I. Using the alkaline comet assay in prognostic test for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagénesis* 2008; 23; 3: 163-170

Wertheman P., Wixon R., Kasperson K. Significant decrease in sperm deoxyribonucleic acid fragmentation after varicocelectomy. *Fertility and Sterility* 2008; 90: 1800-1804.

Ji BT., Shu XO., Linet MS., Zheng W., Walcholder S., Gao Yt., et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89 (3): 238-244.

Weber RF., Dohle GR., Romijn JC. Clinical laboratory evaluation of male subfertility. *Adv Clin Chem* 2005; 40:317-364.

Enciso M., Muriel L., Fernandez JL., Goyanes V., Segrelles E., Marcos M., et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear.

Lipshultz. L., Howards. S. Infertility in the male. Tercera edición. St Louis, Missouri: Mosby 1997. P.468

Wong. WY., Thomas. CMG., et al. Male factor subfertility: posible causes and the impact of nutritional factors. *Fer Steril* 2000; 733:435-442

Armitage P et al. *Statistical methods in medical research*. Oxford, Blackwell Science.  
Brazil C et al. (2004) Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *2002 Journal of Andrology*, 25: 645-656

Kruger TF., Acosta. A., Simmons. K., et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fer Steril* 1988; 49:112-117

Manual de Reproducción Asistida, Red latinoamericana de Reproducción Asistida, Santiago de Chile 2008

Jørgensen N et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*, 2001.16: 1012-1019.

Ballesca. J. Valoración clínica de la función testicular. En: Vanrrelev J., Calaf J., Balasch J., Viscasillas P., *Ferterilidad y Esterilidad Humana: Tomo I Fertilidad y Esterilidad Humana*, Ed: Masson, pag: 23-35

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. Células germinales y fecundación. En *Biología Molecular de la célula*. 2° edición. Pag. 895-936. Barcelona: Omega S.A.

Barone J., De Lara J et al. DNA organization in human spermatozoa. *J Andrology* 1994; 15:139-144.

Ward W., Partin A., Coffey D. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chrososoma* 1998; 98: 153-159.

Ward W., Kimura Y., Yanagimachi R. An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. *Biol Reprod* 1999; 16:30-36.

Ward W. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Human Reprod* 2010; 16:30-36.

Gosálvez et al. Retórica y fragmentación del ADN en el espermatozoide. *Revista iberoamericana de fertilidad* 2008; 3:141-142

Manicardi G., Bianchi P. et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accesibility. *Biology Reproduction* 1995; 52:864-867.

Viloria T., Garrido N., et al. Sperm selection by swim-up terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as mesured by the sperm chromatin dispersión test is altered in heavy smokers. *Fert Steril* 2007; 88:523-525.

McPherson S., Longo F. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage- dependt patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 268-279.

McPherson S., Longo F. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: posible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 1993; 158: 122-130.

Sakkas D., Mariethoz E. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4:31-37.

Sakkas D., Manicardi G. et al. Possible consequences of performing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with sperm possesing nuclear DNA damage. *Human Fertil* 2000; 3:26-30.

Sakkas D, Moffatt O et al. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the posible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1061-1067.

Sakkas D., Alvarez J. et al. Sperm DNA fragmentation: mechanism of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fert Steril* 2010; 93: 1027-1036.

Levesque D., Veilleux S., et al. Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252:602-609.

Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermatogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev* 2001; 58:357-358.

Meyer-Ficca et al. Poly (ADP-ribose) polymerase during chromatin remodeling steps in rat spermatogenesis. *Chromosoma* 2005; 114: 67-74.

Meyer-Ficca M., Lonchar J., et al. Poly (ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 2011; 84:900-909.

Ward W., Coffey D. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44:569-574.

Agarwal A., Said T. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male fertility. *Human Reprod Update* 2003; 9:331-345.

Darley-Usmar V., Wiseman H., Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 1995; 369: 131-135.

De Lamirande E., Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reprod* 1995; 10:15-21.

De Lamirande E., Jiang H, et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rec Reprod* 1997; 2:48-54.

Pascuale, PH., Tucker M., Guelman, V. Fecundación y segmentación. *Atlas de Reproducción Humana: Aspectos clínicos y de laboratorio*. México: McGraw-Hill, 2003.

Aitken RJ., De Lugiis GN. Value of DNA integrity assays for fertility evaluation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 81-92.

Basatemur E., Sutcliffe A. Follow-up of children born after ART. *Placenta* 2008; 29 (Suppl B): 135-40.



Ji BT., Shu XO., Linet MS., Zheng W., Walcholder S., Gao YT et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 238-44.

Sorahan T, Prior P., Lancashire RJ., Faux SP., Hulten MA., Peck IM., et al. Childhood cancer and paternal use of tobacco: deaths from 1971 to 1976. *Br J Cancer* 1997; 76: 1525-31.

Allamameni SS., Naughton CK., Sharma RK., Thomas AJ Jr., Agarwal A. Increased seminal reactive oxygen levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertil Steril* 2004, 82: 1684-6.

Alikani, M., Cohen, J., et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fer Steril* 1999; 71:836-842

Viloria T., Garrido N., Fernandez JL., Remohi J., Pellicer A., Meseguer M. Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil Steril* 2007; 88: 523-525

Vincelette J., Schirm J., Bogard M., Boirgault AM., Lujit DS., Bianchi A et al. Multicenter evaluation of the fully automated Cobas Amplicor PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (1): 74-80

Weidner W., Floren E., Zimmermann O., Thiele D., Ludwig M. Chlamydial antibodies in semen: search for "silent" chlamydial infections in asymptomatic andrological patients. *Infection* 24: 309-313

Habermann B., Krause W. Altered sperm function or sperm antibodies are not associated with chlamydial antibodies in infertile men with leucocytospermia. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1999; 12: 25-29

Vigil P., Morales P., Tapia A., Riquelme R., Salgado AM. *Chlamydia trachomatis* infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrologia* 2002; 34: 155-164

Gunyeli I., Abike F., Dunder I., Aslan C., et al. Chlamydia, Mycoplasma and Ureaplasma infections in infertile couples and effects of these infections on fertility. Arch Gynecol Obstet 2011; 283: 319-385

Cengiz T., Aydongali L., Baykman M., Mungan NA., Tuncbilek E., Dincer M., Yakupoglu K., Akalin Z. Chlamydia infections and male infertility. Int Urol Nephrol 1997; 29: 687-693

Gdoura R., Kchaou W., Ammar-Keskes L., Chakroun N., Sellemi A., Rebai T., Hammami A. Assesment of Chlamydia Trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma Hominis and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. J Androl 2008; 29: 198-206

Vesnik Z., Pospisil L., Svecova D., Zajicova A., Unzeiting V. Chlamydia in the ejaculate: their influence on the quality and morphology of sperm. Acta Obstet Gynecol 2004; 83: 656-660

Bezold G., Politch JA., Kiviat NB., Kuypers JM., Wolff H., Anderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. Fertil Steril 2007; 87:1087-1097

Hosseinzadeh S., Eley A., Pacey AA. Semen quality of men with asymptomatic chlamydial infection. J Androl 2004; 25-104-109

Satta A., Stivala A., Garozzo A., Morello A., et al. Experimental Chlamydia trachomatis infection causes apoptosis in human sperm. Human Reprod 2006; 21:134-137

Eley A., Pacey AA., Galdiero F, Galdiero M. Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm? Lancet Infect 2005; 5:53-57

Gonzales GF, Muñoz G, Sánchez R., Henkel R., et al. Update on the impact of Chlamydia trachomatis infection on male fertility. Andrologia 2004; 36: 1-23

Martínez E. Efecto del varicocele sobre la fertilidad. J Urol 1992; 148:1 805-807

Aitken RJ, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 1994; 16: 259-267

Aitken RJ., Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the generation of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 459-469

Aitken W, Clarkson JS., Hargreave TB, Irvine DS., Wu FC. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligospermia. *J Androl* 1989; 10: 214-220

Alkan I., Simsek F., Haklar G., Kervancioglu E., Ozveri H., Yalcin S et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 157:140-143

Weese D., Peaster M., Kyle K., Leach G., Zimmermann P. Stimulated reactive oxygen species generation in the spermatozoa of infertile men. *J Urol* 1993; 149: 64-67

Mostafa T., Anis TH., El-Nashar A., Iman H., Othman I. Varicocelelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. *Int J Androl* 2001; 24: 261-265

Remohi Giménez J., Cobo A., Prados N., Carbonell J., Martínez A. Fragmentación del ácido desoxirribonucleico en el espermatozoide. En: *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana Laboratorio de Reproducción Asistida*. 4ª Edición. Ed. Panamericana, 2012.

Crohan KR., Griffin JT., Lafromboise M., De Jonge CJ., Carell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006; 27:53-59

Evenson DP., Wixon R. Comparison of the Halosperm test kit with a structure assay (SCSA) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil Steril* 2005; 84:860

Larson KL., De Jonge CJ., Barnes AM., Jost LK., Evenson DP Sperm chromatin structure assays parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive technique. *Human Reprod* 2000; 15:1717-22.

Saleh RA., Agarwal A., Nada EA., El-Tonsy MH., Sharma RK., Meyer A., Nelson DR., Thomas AJ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79: 1597-605.

Sheikh N., Amiri J, Farimani M., Najari R., Hadeie J. Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Iran J Reprod Med* 2008; 6:13-18.

Tandara M., Bajic A., Tandara L., Sunj M., Jurisic Z., Jukic M. Correlation between proportions of sperm with DNA fragmentation assessed by Halosperm test and values of standard quality parameters of semen and possible impact on embryo quality. *Zdrav Vestn* 2013; 82: 298-307.

Yilmaz S., Zergeroglu AD., Yilmaz E., Sofuoglu K., Delikara N., Kutlu P. Effects of sperm DNA fragmentation on semen parameters and ICSI outcome determined by an improved SCD test, Halosperm. *Int J Fertil Steril* 2010; 4: 73-8.

Fernandez JL., Muriel L., Rivero MT., Goyanes V., Vazquez T, Avarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination in male infertility and comparisons with other techniques. *J Andrology* 2001; 23: 25-43.

Sergerie M., Lanforest G., BUjan L., Bissonette F., Bleau G. Sperm DNA fragmentation threshold value in men. *Fertility Human Reprod* 2005; 20 (12): 33446-3451.

Chojan KR., Griffin JT., Lafromboise M., De Jonge CJ., Carre D. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Androl* 2006; 27 (1): 53-9

Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl* 2011; 13: 43-52.

Schelegel PN., Paduch DA. Yet another test of sperm chromatin structure. Fertil Steril 2005; 84: 854-859