



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**Evaluación de la fragmentación de ADN en muestras
seminales de pacientes infértiles seropositivos a VIH**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

PRESENTA

Kasandra Viridiana Arroyo Flores

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Pedro Cuapio Padilla

ASESORAS

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. María Cristina Alvarado Domínguez

Ciudad de México, Febrero, 2024.



**FES
ZARAGOZA**



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Patricia Rosas Saucedo

Vocal: M. en C. Pedro Cuapio Padilla

Secretario: Dra. María Cristina Alvarado Domínguez

1er. Suplente: Dr. Juan José Rodríguez Mercado

2do. Suplente: Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del M. en C. Pedro Cuapio Padilla de HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida del Hospital Español.



AGRADECIMIENTOS

Al **M. en C. Pedro Cuapio Padilla**, por confiar en mí y guiarme a través de esta experiencia, brindarme sus conocimientos, su amistad y transmitirme su pasión por esta área tan maravillosa como lo es la andrología, siempre con amabilidad y una sonrisa. Fue un gran placer trabajar y coincidir con usted, me llevo una gran amistad, gracias por tanto... ¡Siempre adelante!

A la **Dra. Patricia Rosas Saucedo**, por sus comentarios, su apoyo, paciencia y observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo, así como los conocimientos compartidos durante la carrera y agradables historias que compartimos.

A la **Dra. María Cristina Alvarado Domínguez**, por su apoyo y conocimiento transmitido siempre con la calidez, amabilidad y paciencia que la caracterizan, por sus consejos y observaciones compartidos durante este tiempo y por ayudarme a encontrar pasión por el área de la reproducción.

A los doctores **Juan José Rodríguez Mercado** y **Rodrigo Aníbal Mateos Nava** por recibirme en su laboratorio durante el ciclo terminal, compartir su sabiduría y experiencia con mucha pasión, y por los consejos para mejorar este trabajo.

Al **M. en C. Armando Cervantes Sandoval** por las agradables tardes de plática, su comprensión, y por su apoyo y dedicación en la parte estadística de los resultados de esta tesis.

Al **Dr. Carlos Salazar López Ortiz** y al equipo de la clínica **HISPAREP** por permitir que fuera posible la realización de este trabajo y hacer más amena mi estancia durante ese tiempo.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente e impulsarme crecer y convertirse en mi segundo hogar.



A los compañeros y amigos de la carrera de Biología que estuvieron conmigo, Ulises, Sebas, Andy por hacer que este camino fuera más memorable, lleno de muchas experiencias y alegrías que contribuyeron a que esto fuera posible.

A mi compañero de toda la carrera, porque en cada semestre me impulsaste a dar lo mejor de mí y por apoyarme a llegar tan lejos, te deseo mucho éxito en tus proyectos.

A **Rebe, Héctor, Gaby y Pablo**, quienes compartieron conmigo un poco de tiempo durante nuestra estancia en la clínica, gracias por esos momentos llenos de risas, por el apoyo, los consejos y conocimientos compartidos, los quiero.

A **Maggy** porque en tan poquito tiempo de conocernos te has convertido en una amiga incondicional para mí, aprecio mucho la compañía que me has brindado y los grandes momentos llenos de risas y lágrimas, así como el apoyo en la última etapa de este trabajo. Te quiero mucho.

A **Moni**, por estar conmigo desde el primer día de esta experiencia y convertirte en una gran amiga y colega, gracias por las tardes de plática y estar conmigo en buenos y malos momentos, que orgullo verte crecer tanto personal como profesionalmente y que emoción que juntas alcanzamos aquello que veíamos muy lejano. Espero que todos tus sueños se sigan haciendo realidad, ¡¡Por muchas más experiencias y viajes juntas!!

A la **M. en C. Grisel Estrada Manrique**, por permitirme formar parte de su equipo, por brindarme su amistad y confianza durante este tiempo, también por estar al pendiente y apoyarme en esta última etapa, te quiero.

A **Vale**, amiguita, eres una gran mujer y admiro mucho tu dedicación y esfuerzo a todo lo que haces, gracias por ser un gran apoyo y estar pendiente de mi durante este tiempo, te aprecio mucho a ti y a la amistad que me has dado.



A **Ángel**, por siempre tener la disposición de escucharme, brindarme los mejores consejos, también por tu apoyo a lo largo de la carrera y por hacerme reír todo el tiempo, tienes un gran camino por delante, lleno de éxitos y mucha alegría.

A **Marianita**, por tu amistad, tu apoyo y por ser mi compañera de guías de estudio para los exámenes, las clases contigo y con Andy eran de lo más divertido, gracias a ambas por formar un gran equipo conmigo y por continuar con nuestra amistad hasta ahora, espero sea eterna.

A **Nancy y Fery**, me llena de tanta alegría que ambas sigan presentes conmigo y que estemos compartiendo momentos tan importantes de nuestra vida, vernos crecer y alcanzar poco a poco nuestros sueños, gracias por tanto apoyo y cariño, las amo mucho.



DEDICATORIAS

A mis papás

Sin su apoyo y confianza depositados en mí, este momento no habría sido posible, gracias por ayudarme a cumplir mis sueños y por brindarme todas las herramientas necesarias para alcanzar este logro, que hoy me llena de alegría compartir con ustedes. No hay palabras suficientes para agradecer lo que han hecho por Samy y por mí, espero poco a poco poder recompensarles todo el esfuerzo y sacrificios.

Gracias **mamá** por tu amor, tus consejos y no dejar que me rinda durante este proyecto, por enseñarme a ser tan fuerte y perseverante como tú, gracias por todo lo que me has dado durante toda mi vida, te amo.

Gracias **papá** por todo tu apoyo, esfuerzo y los sacrificios que has hecho para que lograra llegar hasta aquí, por alentarme a salir adelante con tu gran carisma, por todo el cariño que nos das y demostrarnos continuamente lo mucho que nos amas.

A mi hermana

Samy, admiro mucho la mujer en la que te has convertido y estoy muy orgullosa de todo lo que has logrado, eres un ser increíble y espero te des cuenta de eso, gracias por escucharme y ser un gran apoyo en todo momento, crecer junto a ti ha sido maravilloso, sigue luchando por tus sueños y sabes que cuentas conmigo para lo que sea.

A **Melody** mi compañera perruna, por acompañarme en mis noches de desvelo y darme tanta alegría día con día, te adoro con todo mi corazón.

A mi tío **Juli**, por siempre estar al pendiente de mí y Samy, por ser nuestro compañero de aventuras y travesuras, por consentirnos, llenarnos de tanto amor y sabios consejos, gracias por estar atento durante este proceso y estar tan animado como yo cada que concluía una etapa, ¡gracias por tanto!



A mis abuelitos

Santa y Agustín, una dedicación especial para ambos, por darme tanto amor, paciencia y cariño a lo largo de toda mi vida, por darme una infancia hermosa, por ser una guía para mí, ustedes son m sostén, admiro mucho las personas tan maravillosas que son, me encanta escuchar sus experiencias y vivencias, me hace muy feliz poder compartir este momento con ustedes, los amo mucho mucho.

A mi mejor amigo

Toby, por darme una de las amistades más bonitas y duraderas, ser mi compañero de vida, por apoyarme en buenos y malos momentos, escucharme, aconsejarme, gracias también por los momentos llenos de carcajadas a través de estos años compartidos y todo el amor que me das, te amo mucho, gracias a ti y a Omi por no soltarme y brindarme mucha ayuda en este proyecto. Por más años juntos!

A mi mejor amiga

Andy, estoy tan agradecida con la vida por ponerte a ti y la amistad tan hermosa que me has dado en mi camino, fuiste una parte esencial a lo largo de la carrera y en la culminación de este proyecto llenándome de mucha felicidad día con día, gracias por no dejarme sola y siempre estar para echarme porras. Adoro ver la gran mujer en la que te estas convirtiendo y deseo que sigas teniendo éxito en todos los proyectos que tengas en mente, mereces lo más bonito de la vida y todos tus sueños cumplidos. Gracias por tanto, te amo!!

A todas y cada una de las personas mencionadas en este trabajo, GRACIAS, por aportar un poquito de felicidad a mi vida e inspirarme a ser mejor día con día y por estar presentes en este momento tan importante, los aprecio y tienen un lugar muy especial en mi corazoncito.



ÍNDICE

1. ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
2. ABREVIATURAS.....	10
3. RESUMEN.....	12
4. INTRODUCCIÓN	13
5. MARCO TEÓRICO	15
5.1 Espermatogénesis.....	15
5.1.1 Etapa Espermatogénica	18
5.1.2 Espermacitogénesis	20
5.1.3 Espermiogénesis.....	21
5.1.4 Espermiación	23
5.2 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo.....	24
5.3 ADN espermático.....	28
5.4 Estructura del espermatozoide humano	30
5.5 Infertilidad masculina.....	31
5.6 Preservación de la fertilidad	32
5.7 Criopreservación de espermatozoides.....	33
5.8 El virus de la inmunodeficiencia humana	36
5.8.1 Replicación del virus	39
5.9 Métodos de diagnóstico del virus de VIH.....	42
5.10 Terapia antirretroviral	43
5.11 Técnica de lavado de espermatozoides	44
5.12 Requisitos para realizar el lavado de espermatozoides.....	46
5.13 Bioseguridad y manejo de residuos	48
5.14 Calidad seminal y criterios según la OMS	51
5.15 Estrés oxidante y Especies Reactivas de Oxígeno.....	54
5.16 Fragmentación del ADN espermático	56
5.16.1 Técnicas de evaluación de la fragmentación del ADN.....	58
5.16.1.1 Electroforesis unicelular en gel	58
5.16.1.2 Ensayo TUNEL.....	59
5.16.1.3 Ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA)	59
5.16.1.4 Ensayo de dispersión de cromatina espermática (SDC)	60



5.17	Control de la fragmentación del ADN espermático	62
6.	JUSTIFICACIÓN	64
7.	HIPÓTESIS	65
8.	OBJETIVOS	66
8.1	Objetivo general.....	66
8.2	Objetivos particulares	66
9.	MATERIAL Y MÉTODOS	67
9.1	Comité de bioética y consentimiento informado	67
9.2	Obtención de la muestra y análisis seminal.....	67
9.2.1	Evaluación de concentración espermática y motilidad	68
9.2.2	Evaluación de la vitalidad de los espermatozoides	69
9.2.3	Evaluación de la morfología de los espermatozoides	70
9.3	Lavado seminal	71
9.4	Criopreservación de la muestra	72
9.5	Análisis de fragmentación del ADN nuclear espermático	74
9.6	Análisis estadístico	75
10.	RESULTADOS	77
10.1	Clasificación por edades	77
10.2	Clasificación por etiología.....	83
10.3	Clasificación por nacionalidad	87
10.4	Correlación de los parámetros seminales en fresco y post-lavado con la fragmentación del ADN	89
11.	DISCUSIÓN	91
12.	CONCLUSIONES	100
13.	REFERENCIAS	101
14.	ANEXOS	111



1. ÍNDICE DE FIGURAS

- ♥ **Figura 1.** Corte transversal del testículo y epidídimo
- ♥ **Figura 2.** Sección transversal de un túbulo seminífero
- ♥ **Figura 3.** Epitelio de los túbulos seminíferos
- ♥ **Figura 4.** Fases de la espermiogénesis
- ♥ **Figura 5.** Eje hipotálamo-hipófisis-testículo
- ♥ **Figura 6.** Partes que comprenden la estructura compleja del espermatozoide
- ♥ **Figura 7.** Genoma del virus del VIH
- ♥ **Figura 8.** Estructura del virión maduro del virus del VIH
- ♥ **Figura 9.** Representación del ciclo de replicación del virus del VIH
- ♥ **Figura 10.** Factores de riesgo y mecanismos moleculares que desencadenan la fragmentación del ADN espermático
- ♥ **Figura 11.** Clasificación espermática de acuerdo con la integridad del ADN mediante SCD
- ♥ **Figura 12.** Tanque de CO₂ con adaptador para pastilla
- ♥ **Figura 13.** Técnica de congelación rápida
- ♥ **Figura 14.** Diferencia en la concentración espermática por grupo de edades de las muestras seminales en fresco y post-lavado
- ♥ **Figura 15.** Comparación en la motilidad progresiva espermática de las muestras seminales en fresco y post-lavado
- ♥ **Figura 16.** Diferencia en el índice de fragmentación del ADN espermático de las muestras seminales en fresco y post-lavado



2. ABREVIATURAS

- ♥ **ABP:** Proteína fijadora de andrógenos
- ♥ **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ♥ **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- ♥ **ARN:** Ácido ribonucleico
- ♥ **ATP:** Adenosín trifosfato
- ♥ **DFI:** Índice de fragmentación del ADN
- ♥ **DHT:** Dihidrotestosterona
- ♥ **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- ♥ **ERO:** Especies reactivas de oxígeno
- ♥ **FIV:** Fecundación *in vitro*
- ♥ **FSH:** Hormona folículo estimulante
- ♥ **GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas
- ♥ **HAART:** Terapia antirretroviral de gran actividad
- ♥ **ICSI:** Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
- ♥ **IMC:** Índice de masa corporal
- ♥ **LH:** Hormona luteinizante
- ♥ **MAI:** Índice de anormalidades múltiples
- ♥ **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- ♥ **OS:** Estrés oxidante
- ♥ **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- ♥ **pH:** Potencial hidrógeno
- ♥ **PROH:** Propanediol
- ♥ **RPBI:** Residuos peligrosos biológico-Infeciosos
- ♥ **SCD:** Dispersión de la cromatina espermática
- ♥ **SDI:** Índice de deformidad espermática
- ♥ **SCSA:** Ensayo de la estructura de la cromatina espermática
- ♥ **SDF:** Fragmentación del ADN
- ♥ **SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

- ♥ **TRA:** Técnicas de reproducción asistida
- ♥ **TUNEL:** Marcación de extremos rotos de ADN por transferasa terminal y dUTP
- ♥ **TZI:** Índice de teratozoospermia
- ♥ **VHB:** Virus de la hepatitis B
- ♥ **VHC:** Virus de la hepatitis C
- ♥ **VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana
- ♥ **VPH:** Virus del papiloma humano.

3. RESUMEN

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) además de comprometer la calidad de vida de los pacientes que se encuentran infectados, puede generar conflicto en aquellas parejas en las que el varón es seropositivo a VIH y desean tener en casa un recién nacido vivo ya que sus opciones reproductivas se ven limitadas con el fin de prevenir la seroconversión de la pareja y el bebé. Las técnicas de reproducción asistida pueden tener un impacto significativo en la prevención de la transmisión viral de parejas serodiscordantes ya que el virus está presente en el plasma seminal de forma libre o asociado a células no espermáticas viéndose afectada la calidad seminal y probablemente el material genético del espermatozoide a través de la fragmentación del ADN. En este aspecto es de vital importancia que la molécula de ADN del espermatozoide se encuentre íntegra durante el proceso de fecundación por lo que, al haber elevados niveles de fragmentación del ADN espermático, conlleva a alteraciones en la fertilización y en el desarrollo embrionario. La técnica de lavado de espermatozoides permite la recuperación de muestras libres del virus y con una mejor calidad. Por lo anterior en este estudio se evaluó la calidad seminal de 61 muestras de pacientes seropositivos a VIH en fresco y después del lavado seminal a través de un seminograma, también se determinó el índice de fragmentación del ADN espermático por medio de la técnica de dispersión de la cromatina espermática y se analizó la correlación entre los parámetros seminales y el índice de fragmentación del ADN. Los resultados obtenidos mostraron disminución en la calidad seminal de los pacientes con VIH, principalmente en la concentración, motilidad espermática y la morfología de los espermatozoides. Los pacientes, además, presentan elevados índices de fragmentación del ADN espermático, sin embargo, no se encontró correlación entre los parámetros seminales afectados y el índice de fragmentación del ADN. Lo anterior, sugiere que en los pacientes con VIH se les realice prueba de fragmentación del ADN de forma rutinaria. En relación a los resultados de lavado seminal en la mayoría de los casos permite la recuperación de muestras con mejor calidad y menor daño en el ADN comparándolo con la muestra en fresco.

4. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un aproximado de 38.4 millones de personas en el mundo que viven con el virus de inmunodeficiencia humana VIH (WHO, 2022), entre las cuáles se encuentran parejas heterosexuales cuyo deseo es tener descendencia y en las que el hombre es seropositivo a VIH, sin embargo, requieren mantener relaciones sexuales con el uso obligatorio del condón para prevenir la seroconversión a VIH de la pareja, por lo que de esta forma resulta imposible concebir el embarazo.

Para estas parejas que buscan conseguir un embarazo, conforme a lo mencionado por Nicopoullos y colaboradores en 2010, sus opciones reproductivas son limitadas a una inseminación de donantes, adopción o técnicas de reproducción asistida a saber, inseminación artificial o fecundación *in vitro* por la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) posterior a un lavado seminal de la muestra infectada para reducir el riesgo de una transmisión viral a la pareja a la hora de la transferencia embrionaria. Esto es importante debido a que además del riesgo de transmisión, los espermatozoides infectados pueden portar aneuploidías y fragmentación del ADN (Garolla *et al.*, 2013).

La fragmentación del ADN en los espermatozoides es un problema muy común en pacientes con alguna patología y una de las principales causas de infertilidad masculina en la actualidad, ya que se ha reportado que la fecundación de estos espermatozoides genera un mal desarrollo embrionario, una falla en la implantación del embrión al momento de la transferencia, abortos espontáneos, al igual que defectos congénitos en la descendencia (Riva *et al.*, 2016).

Varios estudios han señalado una correlación entre espermatozoides con un alto índice de fragmentación del ADN y la calidad seminal que tiene la muestra, ya que pacientes con problemas de fertilidad que presentan espermatozoides con morfología anormal y bajos niveles de motilidad muestran mayor daño en el ADN en comparación con espermatozoides considerados como normales según los criterios de la OMS (Sadeghi *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2020).

Lo ya mencionado lleva a abordar el tema del presente estudio a consecuencia de que Ahmad y colaboradores en 2011 destacan que en muestras de pacientes seropositivos a VIH se encontraron anomalías en los parámetros seminales como el volumen, pH y de forma más común en la concentración, motilidad espermática y la morfología, estas dos últimas se relacionan con la presencia de daño en el material genético del espermatozoide, lo que nos puede indicar que los espermatozoides de estos pacientes tienen altos índices de fragmentación del ADN.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis, de acuerdo con Kretser y colaboradores (2016), es un proceso complejo y dinámico que se lleva a cabo dentro de los túbulos seminíferos ubicados en los testículos, cuyo fin es dar lugar a la formación de espermatozoides maduros a partir de células germinales, este proceso comienza en la pubertad en los seres humanos, tiene una duración aproximada de 72 días y depende de la proliferación y maduración de células germinales derivadas de células madre autorrenovables.

Es un proceso constante que está regulado por hormonas y factores de crecimiento del hipotálamo e hipófisis o dentro de los propios testículos (Kuchakulla *et al.*, 2020).

Un hombre adulto tiene una producción aproximada de 1000 nuevos espermatozoides por segundo y, en un hombre promedio, los testículos producen un aproximado de 200 a 300 millones de espermatozoides diarios, de los cuales únicamente 100 millones se convierten en gametos maduros viables (Griswold, 2016; Kretser *et al.*, 2016).

Los testículos son las gónadas masculinas responsables de la producción espermática (gametogénesis) y la producción de andrógenos (esteroidogénesis). Tienen una ubicación externa que brinda un entorno de 2 a 4 °C debajo de la temperatura corporal normal, lo cual beneficia la adecuada producción de espermatozoides. El par de testículos en los hombres adultos presentan una consistencia firme con la longitud de entre 4 y 5 cm y el peso que varía entre los 10 y 15 g cada uno (Ivell, 2007).

En la **Figura 1** se observa que los testículos se encuentran cubiertos por tres capas, la capa más externa es la túnica vaginal, posterior a ella se encuentra una capa fibrosa gruesa de apariencia opaca debido a la abundancia de fibras de colágeno denominada túnica albugínea, la cual penetra al interior del testículo dividiéndolo en

lobulillos y formando el mediastino, y la túnica vasculosa formada por la arteria testicular que desciende por debajo de la túnica albugínea (Kretser *et al.*, 2016; Kalthur y Kalthur, 2017).

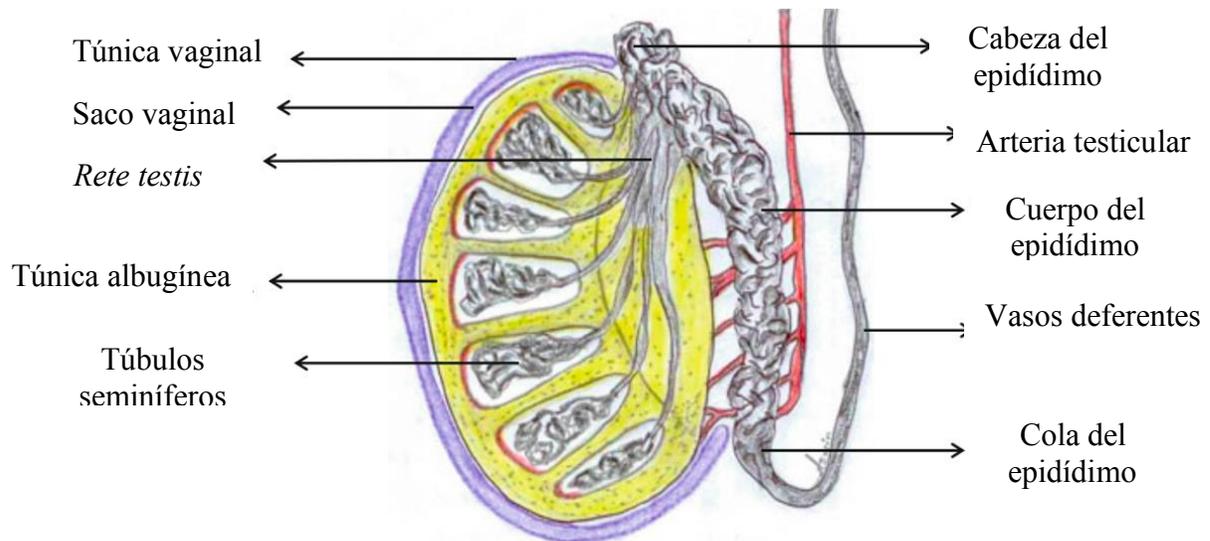


Figura 1. Corte transversal del testículo y epidídimo. Se pueden observar las tres capas que recubren al testículo, las partes que lo componen y la forma en que está conformado el epidídimo (modificado de Kalthur y Kalthur, 2017).

Cada testículo se encuentra dividido en un aproximado de 250 lobulillos conteniendo de 400 a 600 túbulos seminíferos de entre 70 y 80 cm de longitud, y que ocupan casi el 60 % del volumen testicular. Los túbulos seminíferos están rodeados por una lámina basal con epitelio estratificado conformado por células madre espermatogénicas o células germinales y células de soporte denominadas células de Sertoli, **Figura 2** (Kalthur y Kalthur, 2017).

Además de brindar soporte a las células que se encuentran en los túbulos seminíferos, las células de Sertoli cumplen con diversas funciones que a su vez son esenciales para un adecuado desarrollo del proceso de la espermatogénesis.

Entre ellas las más destacadas son, el proporcionar nutrición a las células germinales, mantenimiento de la integridad del epitelio seminífero, producción de sustancias endocrinas y paracrinas para la regulación de la espermatogénesis como

el caso de la inhibina, secreción de la proteína de unión a andrógenos e interacción con las células endocrinas de Leydig (Holstein *et al.*, 2003; Bharath, 2017).

Adicionalmente, un papel esencial de las células de Sertoli es dar protección a las células germinales por medio de la barrera hematotesticular misma que se forma por la unión de las proyecciones citoplasmáticas de dichas células. La barrera se estabiliza por medio de filamentos de actina y proteínas de unión a actina (Mawhinney y Mariotti, 2013).

Este mecanismo de defensa divide al testículo en compartimentos basal y adluminal proporcionando una obstrucción física entre las células germinales ubicadas en el compartimento adluminal de los sistemas circulatorio y linfático, formando de este modo entornos únicos que promueven una espermatogénesis exitosa (Kuchakulla *et al.*, 2020).

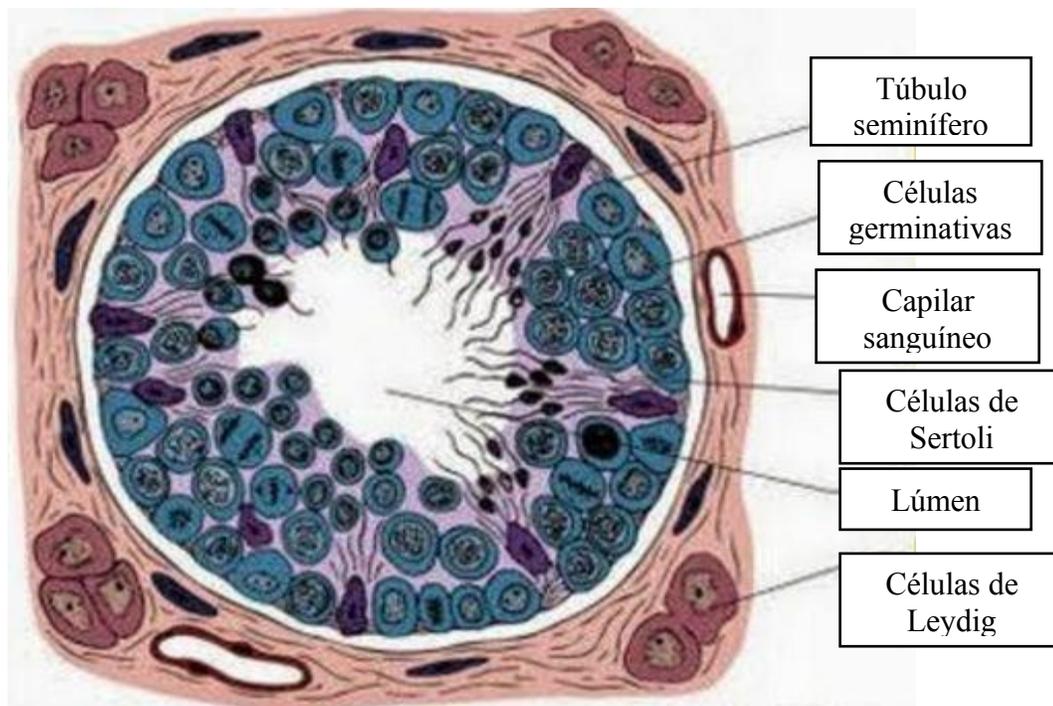


Figura 2. Sección transversal de un túbulo seminífero. Se aprecia las células y estructuras que conforman al túbulo seminífero desde el compartimento basal al adluminal, así como el tejido peritubular (modificado de <https://www.pinterest.com/pin/240520436329769877/>).

Los extremos de los túbulos seminíferos se abren en los espacios de la *rete testis* donde se recoge el líquido secretado por los túbulos y es enviado al sistema ductal excurrente del epidídimo (Smith y Walker, 2014). En el transporte de los espermatozoides maduros pero inmóviles hacia la *rete testis*, participan las células ubicadas en el tejido peritubular que consiste en cinco capas de células mioideas o miofibroblastos que provocan contracciones peristálticas del túbulo seminífero (Holstein *et al.*, 2003).

De acuerdo con diversos autores, la espermatogénesis se encuentra dividida en cuatro fases o etapas: a) Espermatogénica en la que la espermatogonia se encuentra en constante multiplicación por mitosis; b) Espermacitogénesis, etapa en la que ocurre la división meiótica; c) Espermiogénesis, transformación de la espermatide redonda en espermatozoide y; d) Espermiación la cual consiste en el desprendimiento del espermatozoide maduro de las células de Sertoli hacia la *rete testis*.

5.1.1 Etapa Espermatogénica

Durante esta etapa se pueden distinguir tres tipos de espermatogonias, clasificadas así por su morfología y la tinción de sus núcleos, ubicadas en la parte basal del epitelio germinal. En primera instancia, tenemos a las espermatogonias de tipo A que se dividen en tipo A pálido (Ap), con cromatina intensamente coloreada y dispersa, y tipo A oscuro (Ad) con cromatina de color débil, así como poco dispersa (Figura 3), ambas pertenecen al conjunto de células madre de la espermatogénesis (Paoli *et al.*, 2020).

El tercer tipo de espermatogonias es el tipo B que según mencionan Holstein y colaboradores en 2003, representan el inicio del desarrollo de las células germinales hasta las espermatides mediante división meiótica. Las espermatogonias se encuentran continuamente bajo división mitótica, sin embargo, la división suele ser incompleta lo que conlleva a que las células se mantengan interconectadas entre sí a través de puentes citoplasmáticos, como se puede apreciar en la **Figura 3**. La

conexión se mantiene a lo largo de las demás etapas del ciclo hasta que las espermatíidas maduras se liberan en la luz del túbulo.

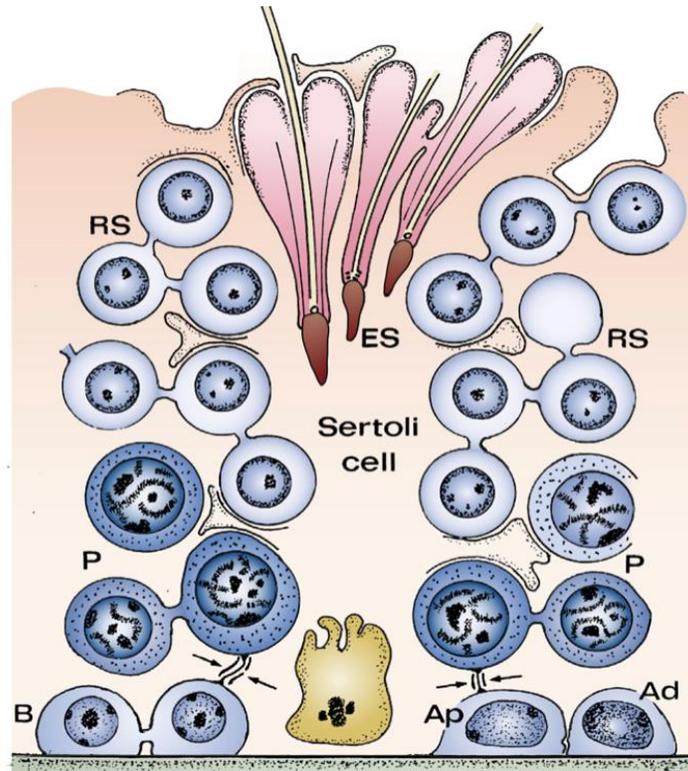


Figura 3. Epitelio de los túbulos seminíferos. Se observan los tres tipos de espermatogonias en la parte basal del epitelio y la diferencia en la coloración de la cromatina, a su vez se representa la interconexión entre las espermatogonias previo a la mitosis. Están representadas las células de Sertoli y la forma en que separa las fases del ciclo, así como las etapas de las células germinales (Kretser *et al.*, 2016). **Ad** (espermatogonia tipo A oscuro), **Ap** (espermatogonia tipo A pálido), **B** (espermatogonia tipo B), **P** (espermatoцитos primarios), **RS** (espermatíidas redondas tempranas), **ES** (espermatíidas elongadas) (tomado de Kretser *et al.*, 2016).

La primera división mitótica se da en las espermatogonias tipo Ad obteniendo células tipo Ap y tipo Ad indiferenciadas, que van a fungir como reserva de células madre para posteriores ciclos de multiplicación. Las espermatogonias Ap son las que van a pasar por otra mitosis y de esta forma se generan las espermatogonias tipo B, que, de igual forma, se dividen por mitosis y progresan para convertirse en espermatoцитos primarios diploides (Holstein *et al.*, 2003; Kretser *et al.*, 2016).

Previo a dar comienzo a la siguiente etapa del ciclo, los espermatoцитos primarios ingresan a la fase S con el fin de duplicar su ADN mientras que atraviesan la barrera

hematotesticular hacia el compartimento adluminal donde comenzará la meiosis I. Como consecuencia de esta duplicación, cada cromosoma contiene dos cromátidas por lo que el contenido de ADN de los espermatoцитos primarios es (4C), en adición, Holstein y colaboradores (2003) destacan que los espermatoцитos primarios son las células más grandes del epitelio germinal.

5.1.2 Espermatocitogénesis

Durante esta etapa, los espermatoцитos primarios pasan por dos divisiones meióticas, la primera es bastante larga, particularmente la profase en la que se lleva a cabo el aumento progresivo del tamaño de los núcleos de los espermatoцитos primarios 4C y la recombinación genética de los cromosomas homólogos.

La **profase I** de la **meiosis I** se caracteriza por tener cinco etapas. En el **leptoteno**, se observan los cromosomas como filamentos delgados enredados; en **cigoteno**, los cromosomas continúan condensándose y además se produce el emparejamiento de cromosomas homólogos, o complejo sinaptonémico cuya función es mantener unidos y alineados a los cromosomas. En el **paquiteno**, los cromosomas emparejados se acortan, se engrosan, y se da el entrecruzamiento de ADN lo que permite la variabilidad genética, este entrecruzamiento se hace evidente a través de los quiasmas; además aumenta de tamaño la célula. La penúltima fase es el **diploteno**, marcado por la desaparición del complejo sinaptonémico y la separación parcial de los cromosomas debido a que permanecen unidos a los quiasmas, en tanto que en la última de estas etapas la **diacinesis** sigue la condensación de los cromosomas (Kretser *et al.*, 2016; Pierce, 2016; Paoli *et al.*, 2020).

Casi al final de la profase I, la membrana nuclear se desintegra y se forma el huso, evento que prepara a la célula para la **metafase I**. En la metafase I los pares de cromosomas homólogos ya condensados se alinean en el huso o placa ecuatorial dando paso a la **anafase I**, en la que los pares de cromosomas se separan y migran a los polos opuestos de la célula. La siguiente etapa es la **telofase I**, los

cromosomas llegan a los polos y el citoplasma se divide por **citocinesis** para formar dos células (Paoli *et al.*, 2020).

Las dos células hijas resultantes de esta primera división, son haploides (n) y se denominan espermatocitos secundarios, células que pasan por la segunda división meiótica. Previo a la segunda división ocurre la **intercinesis** en la que no se da una síntesis de ADN, pero vuelve a formarse la membrana nuclear alrededor de los cromosomas encontrados en los polos, de igual forma se rompe el huso y los cromosomas se relajan (Pierce, 2016).

La **meiosis II** ocurre de manera rápida, aproximadamente menos de 24 horas, y tras progresar de la **profase II** a la **telofase II** en donde se involucra la separación de las cromátidas hermanas a lo largo del centrómero, se obtienen cuatro espermátidas haploides con material genético recombinado de forma única. Las espermátidas al principio son células redondas que van a pasar por una serie de cambios para transformarse en células flageladas y alargadas conocidas como espermatozoides (Holstein *et al.*, 2003).

5.1.3 Espermiogénesis

La espermiogénesis se caracteriza por ser una etapa compleja en la que la espermátida haploide redonda se transforma en un espermatozoide con capacidad de moverse. Esta penúltima etapa del ciclo de espermatogénesis no atraviesa por un proceso de división, más bien sufre una especie de metamorfosis y reordenamiento cromosómico que suele durar aproximadamente 24 días en los humanos y se divide a su vez en cuatro fases que, de acuerdo con la literatura, son (**Figura 4**):

- **Fase de Golgi.** Se caracteriza por el desarrollo del acrosoma en la cabeza y del axonema. La cabeza del espermatozoide se forma en un extremo mediante enzimas empaquetadas en el aparato de Golgi, además se producen vesículas pequeñas que se fusionan para contribuir a una vesícula acrosómica denominada gránulo acrosómico.

- **Fase de capuchón.** Durante esta, el aparato de Golgi empieza a rodear al núcleo y se convertirá en el capuchón o casquete acrosomal. Paoli y colaboradores (2020) añaden que esta fase implica la expansión de la membrana que limita la vesícula acrosomal o el gránulo acrosómico que se extiende alrededor de dos tercios anteriores del núcleo cubriendo así la mitad del polo craneal.
- **Fase acrosómica.** Está marcada por el alargamiento del núcleo y su desplazamiento hacia un polo de la célula, mientras se da el alargamiento del núcleo, este a su vez comienza el proceso de compactación. De igual forma se producen variaciones en el acrosoma y el flagelo, ya que el citoplasma se mueve hacia la zona caudal y envuelve la parte proximal del flagelo donde se disponen las mitocondrias.
- **Fase de maduración.** Es la última fase de la espermiogénesis de modo que durante esta el espermatozoide va a tomar su forma característica. Para que este evento ocurra, tiene lugar la participación de las células de Sertoli quienes se van a encargar de eliminar el exceso de citoplasma mediante fagocitosis, así mismo el núcleo se compacta y se vuelve homogéneo, el flagelo sufre sus últimos cambios. (Kerr, 1992; Kretser *et al.*, 2016; Kuchakulla *et al.*, 2020; Paoli *et al.*, 2020).

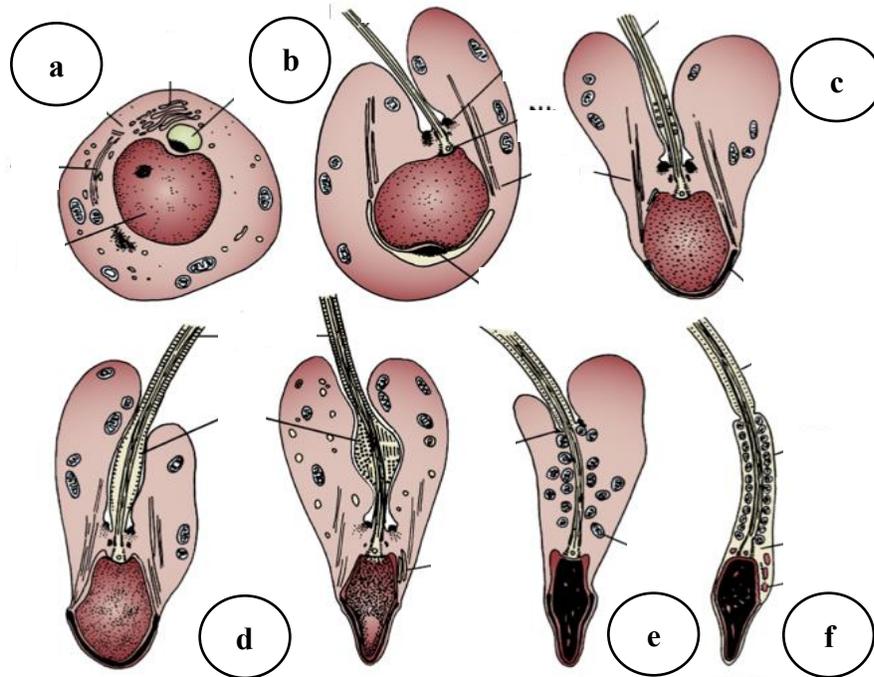


Figura 4. Fases de espermiogénesis. En la figura se pueden observar los cambios por lo que atraviesa la espermátida madura para transformarse en un espermatozoide con capacidad de moverse por sí mismo. Los pasos a, b y c, corresponden a la fase de Golgi y de capuchón. C y d representan la fase de acrosoma. E y f representan la fase de maduración (modificado de Kretser *et al.*, 2016).

5.1.4 Espermiación

Finalmente, en la etapa de espermiación, conforme las células van sufriendo las divisiones y cambios, son transportadas por el líquido tubular hacia la luz de los túbulos seminíferos permitiendo su liberación hacia el epidídimo gestionada por las células de Sertoli a través de sus filamentos intermedios y túbulos citoplasmáticos (Holstein *et al.*, 2003).

En este sentido, está claro que las células de Sertoli durante la espermiación, también desempeñan un papel crucial gracias a sus túbulos citoplasmáticos o microtúbulos, los cuáles presentan una abundante expresión de proteínas motoras (dineína y quinesina) que, junto con los filamentos intermedios, influyen en la posición de las células germinales y a su vez, dirigen el movimiento de las

espermátidas en elongación en dirección hacia el compartimento basal a través de la quinesina (Krester *et al.*, 2016).

Y una vez que las espermátidas se encuentran en una etapa más avanzada de maduración, específicamente cuando comienza a formarse el flagelo y alargarse el axonema, la dineína actúa y las traslada hacia la región adluminal.

De esta forma los espermatozoides se pueden transportar libremente al epidídimo mediante la contracción del músculo liso, las corrientes ciliares y la propulsión del líquido testicular para completar su maduración, adquirir motilidad y permanecer almacenados (Kuchakulla *et al.*, 2020).

5.2 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo

En lo que respecta al control y regulación de la espermatogénesis, la acción endocrina del eje hipotálamo-hipófisis-testículo es un tema para destacar ya que de este dependen los procesos reguladores hormonales intratesticulares y extratesticulares.

El eje hipotálamo-hipófisis-testículo está regulado principalmente por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), deca péptido secretado de forma pulsátil y liberado por exocitosis por el hipotálamo, el cuál es una región del cerebro anterior que se encuentra dividida en pares de núcleos siendo el núcleo arcuato y el área preóptica hipotalámica anterior los sitios dónde se encuentran las neuronas que sintetizan la GnRH.

Al ser liberada la GnRH, es vertida a los vasos sanguíneos del sistema porta hacia la eminencia media y de ahí a la adenohipófisis, donde estimula a los gonadotropos para la liberación de dos gonadotropinas polipeptídicas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), las cuáles actúan sobre el testículo iniciando la espermatogénesis y la producción de testosterona, **Figura 5** (Arce *et al.*, 2006).



Una vez que es secretada la LH, se une a un aproximado de 20,000 de sus receptores ubicados en la superficie de las células de Leydig, provocando la estimulación de la síntesis de testosterona a partir del colesterol mediante la activación del sistema del segundo mensajero del adenosín monofosfato cíclico (AMPc). La testosterona, es una hormona esteroidea que desempeña un papel importante en el control hormonal, al ser sintetizada, es liberada a la sangre para llegar a las células de Sertoli y a todo el organismo (Carlson, 2009).

Con respecto a las células de Sertoli, expresan receptores de membrana de FSH lo que permite que sean estimuladas por esta hormona y de esta manera estimular la espermatogénesis a través de factores de transcripción involucrados en la proliferación de células germinales, y facilita la secreción de transferrina que de acuerdo con Bharath en 2017, es vital para mantener la espermatogénesis.

De igual forma, mediante receptores citoplasmáticos reciben estimulación por parte de la testosterona de las células de Leydig. Dicha estimulación da paso a la conversión de cierta cantidad de testosterona en estrógenos (estradiol) a partir de la enzima aromatasa, enzima expresada en el tejido adiposo, los testículos y el cerebro, parte de los estrógenos formados se transportan de regreso a las células de Leydig. El estradiol tiene un papel importante en la retroalimentación negativa al reducir la pulsatilidad de la LH. Parte de la testosterona que no es sometida a aromatización es transformada por la enzima 5-alfa reductasa en dihidrotestosterona (DHT), este tipo de testosterona presenta mayor afinidad para unirse a los receptores de andrógenos (Carlson, 2009; Dwyer y Quinton, 2019).

La estimulación por FSH de las células de Sertoli genera la producción de la proteína ligadora de andrógenos, misma que se une a la testosterona. La estimulación de las células de Sertoli por las hormonas ya mencionadas y posterior al proceso de fagocitosis de los residuos de citoplasma de los espermatozoides en la espermiogénesis, da paso a la producción de inhibina (Goldberg *et al.*, 2022). La inhibina es una glicoproteína de la familia de proteínas TGF- β , por la subunidad que las componen se clasifican en inhibina A o B; en los hombres predomina la inhibina

B. Dicha hormona se encarga de controlar la secreción de FSH mediante retroalimentación negativa (Bharath, 2017).



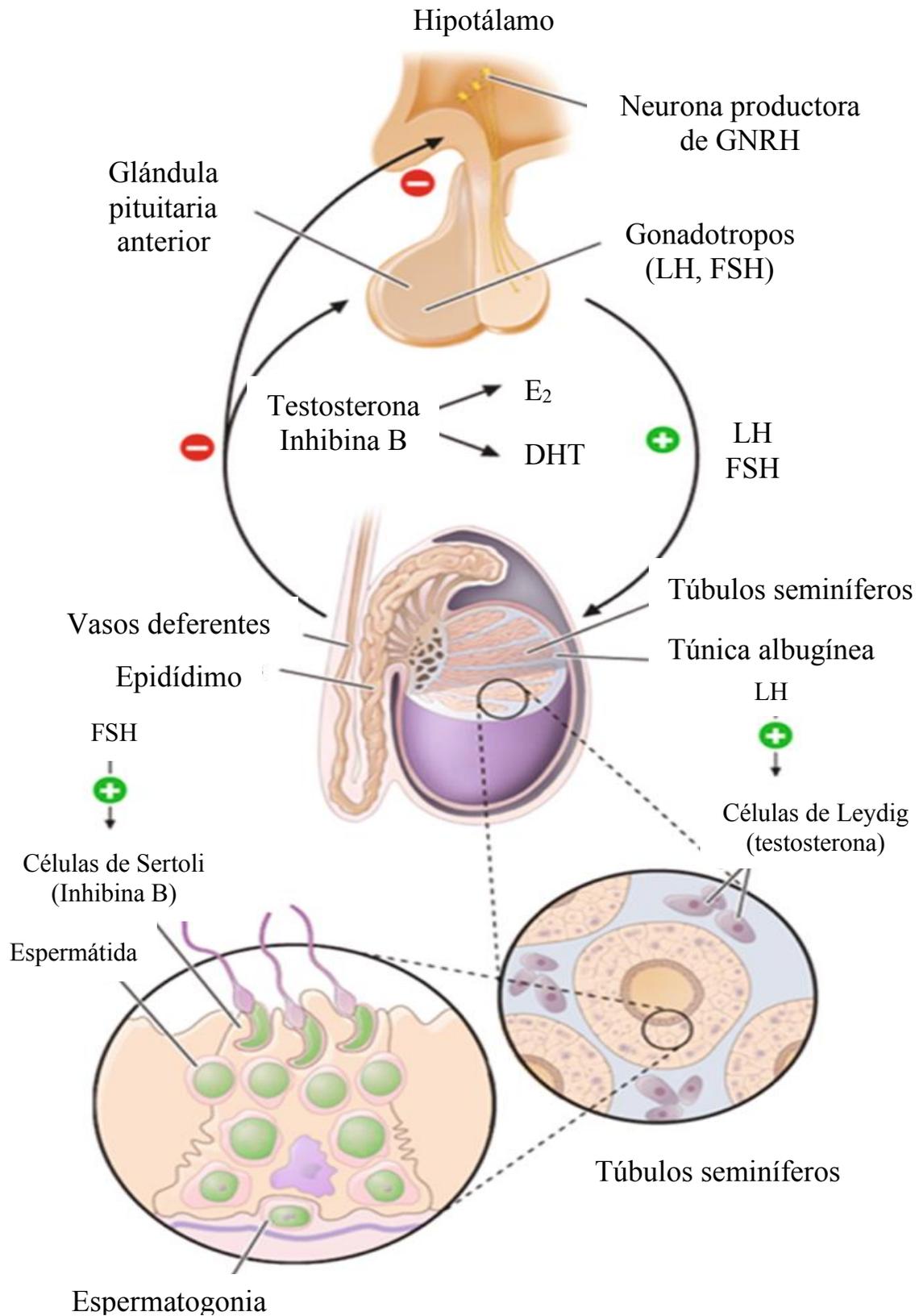


Figura 5. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La secreción pulsátil de la hormona GnRH en el hipotálamo estimula la liberación de las gonadotropinas FSH y LH en la adenohipófisis (modificado de Dwyer y Quinton, 2019).

Por lo tanto, se puede entender que un correcto desarrollo del proceso espermatogénico depende de factores como la estimulación endocrina adecuada de los testículos por las gonadotropinas (FSH y LH), andrógenos y factores paracrinos y autocrinos; la interacción dinámica de las células de Sertoli con las células germinales en desarrollo, así mismo, el mantenimiento del entorno único dentro del túbulo seminífero facilitado por las células de Sertoli, mediante la restricción de la entrada de otras células.

Algún fallo o alteración en alguno de estos factores resulta en la interrupción de la espermatogénesis y, en consecuencia, defectos en los espermatozoides y su recuento, así como afectación en el ADN espermático (Smith y Walker, 2014). Tomando en cuenta lo anterior, para que el espermatozoide pueda adquirir una adecuada motilidad, completar su maduración y de esta forma atravesar el tracto reproductor femenino y sea capaz de participar en el proceso de fecundación, es de gran relevancia que el ADN del gameto masculino se encuentre en buenas condiciones.

5.3 ADN espermático

Al completarse la espermiogénesis, se produce simultáneamente la condensación y remodelación de la cromatina, principalmente durante la fase de maduración en la de la misma; la remodelación de la cromatina es el proceso en el que las histonas son reemplazadas en 85 % por protaminas, esta transición compacta el genoma del espermatozoide seis veces en una estructura de cromatina toroidal necesaria para el desarrollo normal del espermatozoide (Kuchakulla *et al.*, 2020).

El proceso de protaminación de la cromatina espermática además de compactar el núcleo para una adecuada motilidad del espermatozoide, va a proteger al genoma espermático de la oxidación y moléculas dañinas que se encuentran en el sistema reproductor femenino. Las protaminas son proteínas pequeñas que se sintetizan en etapas avanzadas de la espermatogénesis, son ricas en arginina y cisteína y se encuentran localizadas en el núcleo del espermatozoide siendo las proteínas más

abundantes en estas células y, no se encuentran en otro lugar (Carlson, 2009; Gunes *et al.*, 2015).

Previo al reemplazo de histonas por protaminas, las histonas son sustituidas por variantes de histonas mediante hiperacetilación, esto permite que se reduzca su afinidad de unión al ADN y por consiguiente contribuye a la relajación y estimulación de las roturas de las hebras del ADN a través de la activación de la enzima topoisomerasa. En este punto, la variante de histona H2B (TH2B) es la más común en los espermatozoides maduros y es la principal responsable del desplazamiento de las histonas (Francis *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2022).

La topoisomerasa II es la encargada de generar las roturas en la cadena de ADN necesarias después del cambio a variantes de histonas para permitir el reemplazo de las histonas por proteínas de transición, la topoisomerasa II actúa uniéndose covalentemente al grupo fosfato del ADN rompiendo de esta forma el enlace fosfodiéster en las hebras simples y dobles de la cadena. Las proteínas de transición TP1 y TP2 reemplazan a las variantes de histonas, en adición Kuchakulla y colaboradores (2020) mencionan que la proteína TP1 se encarga de fusionarse con el ADN y de eliminar las histonas y consideran que la proteína TP2 participa en la condensación por protaminas (Francis *et al.*, 2014).

A continuación, las proteínas de transición son reemplazadas por las protaminas fosforiladas PRM1 y PRM2, que van a provocar la formación de las estructuras toroidales, mismas que permiten el empaquetamiento y compactación aumentada característica del espermatozoide, compactación dada por la formación de puentes disulfuro inter e intramoleculares (Hamilton y Assumpção, 2019).

La extensa remodelación de la cromatina es de igual forma muy importante durante el ciclo de la espermatogénesis y, por lo tanto, alguna anomalía durante este reacomodo puede inducir daño en el ADN espermático, infertilidad masculina e incluso, la muerte del embrión en caso de que se dé la fecundación.

5.4 Estructura del espermatozoide humano

El espermatozoide es una célula compleja cuya función y objetivo es transportar hasta el ovocito el material genético haploide que se encuentra fuertemente condensado por las protaminas. Para poder llevar a cabo su función de manera exitosa, el espermatozoide cuenta con una estructura especializada descrita por Antonie van Leeuwenhoek en 1677 (Kannan, 2017).

Al observar esta célula madura bajo el microscopio, se puede notar que consiste en una cabeza de forma apical ovalada aplanada, un cuello o pieza media corta y un flagelo largo y delgado, **Figura 6**.

La cabeza del espermatozoide se encuentra formada por el núcleo que como se mencionó con anterioridad, es compacto y contiene el ADN condensado con la dotación cromosómica haploide y el acrosoma; este último con forma de casquete con dos membranas, una interna que está en contacto con la membrana nuclear y la membrana acrosómica externa posicionada debajo de la membrana plasmática. Con respecto a su tamaño, la cabeza del espermatozoide mide de 4 a 5 μm de diámetro (Paoli *et al.*, 2020).

El acrosoma, además, contiene enzimas líticas de las que destacan la hialuronidasa, acrosina y proteasas, necesarias para permitir cruzar las capas externas del ovocito, específicamente la zona pelúcida, produciendo la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana externa del acrosoma, proceso denominado como reacción acrosómica (Kannan, 2017).

La pieza media o cuello se extiende desde la parte posterior de la membrana nuclear hasta el sitio donde el segmento intermedio de la cola se une a la cabeza, este segmento del espermatozoide se caracteriza por contener una vaina mitocondrial, en la que las mitocondrias se encuentran dispuestas en un patrón helicoidal rodeando al axonema, permitiendo que sea el sitio de producción de energía y suministro de ATP necesario para el buen funcionamiento del axonema y por lo tanto, para una adecuada motilidad del espermatozoide (Kannan, 2017).

El axonema, que constituye el aparato motor del flagelo del espermatozoide, está compuesto por un par de microtúbulos, siendo la tubulina el componente estructural de ellos y brazos de dineína, ubicados en el centro y nueve pares situados en la periferia, este complejo axonemal se extiende a lo largo de toda la cola y se divide en segmento intermedio, de 5 a 6 μm de largo, un segmento principal con una longitud aproximada de 45 μm , y el segmento final de 5 μm de longitud (Paoli *et al.*, 2020).

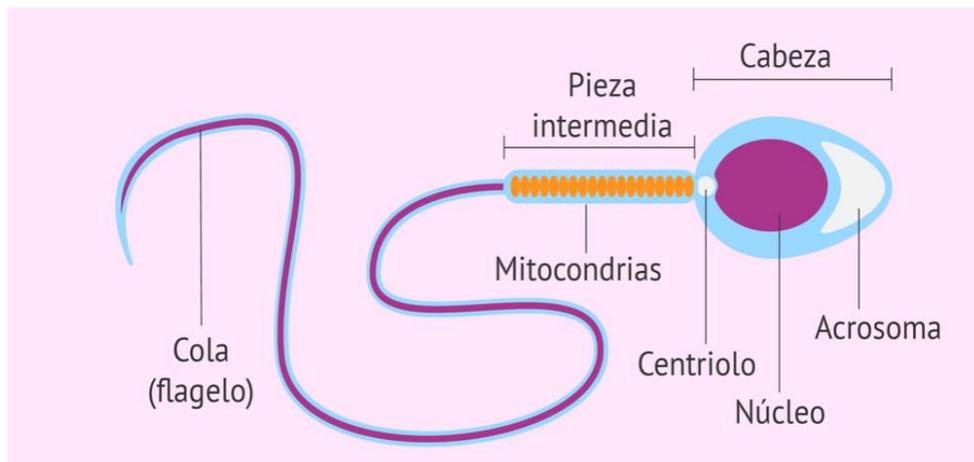


Figura 6. Partes que comprenden la estructura compleja del espermatozoide. En la figura podemos apreciar la estructura completa de un espermatozoide, dividiéndose principalmente en una cabeza, pieza intermedia y el flagelo (tomado de Espejo y Salvador, 2019).

Por consiguiente, un espermatozoide que tenga una anomalía o defecto en cualquier parte de su estructura está relacionado con el descenso en la fertilidad del hombre debido a que el espermatozoide no conseguirá llegar hasta el ovocito de forma natural y, en consecuencia, lograr la fecundación.

5.5 Infertilidad masculina

Se define como infertilidad a la incapacidad de concebir el embarazo transcurridos 12 meses de mantener relaciones sexuales sin el empleo de un método anticonceptivo (WHO, 2023). Flores (2018) destaca que aproximadamente el 15 % de las parejas son afectadas por este problema.

Con el transcurso de los años, las tasas de prevalencia e incidencia de la infertilidad son elevadas, convirtiéndose en un serio problema de salud en el mundo debido a que también suele tener repercusiones a nivel psicosocial afectando la calidad de vida de las personas (Restrepo y Cardona, 2013).

Los factores masculinos son responsables de aproximadamente el 50 % de los casos de infertilidad. La infertilidad masculina representa una enfermedad compleja y multifactorial, además, Loloi y colaboradores (2022) mencionan que es muy común que los hombres que padecen de infertilidad suelen tener una presión psicológica y sentimientos de baja autoestima.

La causa principal de la infertilidad no es clara en la mayoría de los pacientes debido a la amplia gama de etiologías y factores de riesgo involucrados, por ejemplo, la alteración de la espermatogénesis que puede ser provocada por cáncer testicular, varicocele, trastornos inmunológicos como la presencia de anticuerpos antiespermatozoides, factores genéticos, infecciones virales crónicas, factores tóxico-ambientales y daño al ADN espermático e (Restrepo y Cardona, 2013; Uribe, 2017).

Garrolla y colaboradores (2013) argumentan que se subestima la relevancia de las infecciones virales crónicas como un factor etiológico de la infertilidad masculina. Se ha demostrado que los hombres que padecen este tipo de infecciones muestran una reducción en la fertilidad por alteración en los parámetros seminales, entre los principales virus crónicos que se ha demostrado que tienen efecto desfavorable sobre la fertilidad masculina se encuentra el virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), el virus del papiloma humano (VPH) y el **virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)**.

5.6 Preservación de la fertilidad

En la actualidad existen diversos motivos por los que tanto hombres y mujeres requieren del almacenamiento de sus gametos con el fin de preservar su fertilidad, para esto, el banco de semen o de óvulos permite guardar muestras congeladas y

asegurar la posibilidad de concebir un hijo en caso de pérdida previsible o imprevisible de la fertilidad (Stornelli *et al.*, 2005). Respecto al varón, entre las razones por las que requiera de esta opción terapéutica se encuentra:

- I. Pacientes en edad reproductiva diagnosticados con cáncer y que van a recibir tratamientos oncológicos como quimioterapia, radioterapia o cirugía que puedan ocasionarles esterilidad transitoria o definitiva.
- II. Varones que serán sometidos a vasectomía y en un futuro puedan decidir tener un hijo.
- III. Pacientes con problemas de eyaculación por eyaculación retrógrada, disfunción eréctil, malformaciones congénitas, entre otras.
- IV. Pacientes con enfermedades infecciosas virales que son transmitidas vía sexual, por lo que la congelación del semen o criopreservación de espermatozoides. Este procedimiento es adecuado para evitar el periodo ventana de enfermedades infecciosas, entre ellas el VIH, en lo que se comprueba que la muestra puede ser utilizada con seguridad (Stornelli *et al.*, 2005).

5.7 Criopreservación de espermatozoides

La criopreservación de espermatozoides se ha convertido en una herramienta fundamental en los laboratorios de reproducción asistida al permitir la optimización de los tratamientos de esterilidad y la preservación de la fertilidad masculina en pacientes en los que podría verse reducida o perderla por tratamientos agresivos siendo la quimioterapia, radioterapia o cirugías invasivas los que provocan insuficiencia testicular o una disfunción eyaculatoria (Donnelly *et al.*, 2001; Riva *et al.*, 2016).

Para lograr la preservación de la fertilidad, la criopreservación mantiene la viabilidad y funcionalidad del gameto a bajas temperaturas por el nitrógeno líquido (-196 °C)



durante un largo periodo de tiempo frenando el envejecimiento y la degeneración celular. Durante la realización de esta técnica, **los agentes crioprotectores** juegan un papel fundamental en la protección del gameto, ya que son soluciones que deshidratan paulatinamente al espermatozoide evitando así la formación de cristales de hielo intracelulares y extracelulares que generan lesiones en las estructuras citoplasmáticas, además, Stornelli y colaboradores (2005) señalan que permiten mantener mayor proporción de agua a bajas temperaturas y por lo tanto, se tiene menor concentración de electrolitos haciendo posible la supervivencia celular, sin embargo, se ha descubierto que los crioprotectores pueden ser citotóxicos y provocar incremento de los niveles de ERO en los espermatozoides, provocando daños adicionales en el ADN (Liu *et al.*, 2016).

Los crioprotectores se dividen en dos categorías, crioprotectores penetrantes y no penetrantes, asimismo los crioprotectores contienen tampones que se encargan de mantener el pH como el TRI y HEPES, quelantes que disminuyen la concentración de iones de calcio a través de la membrana plasmática, tal es el caso del EDTA y el citrato, y también deben incluir albúmina o lectina por ser moléculas que estabilizan la membrana espermática sustituyendo a la yema de huevo. Los crioprotectores penetrantes se caracterizan por su bajo peso molecular con permeabilidad a través de la membrana espermática permitiendo el desplazamiento de agua celular, acción que protege a la célula de las lesiones que puedan producirse por la congelación a velocidad lenta, en esta categoría se encuentra el glicerol, el etilenglicol, propanediol y el dimetilsulfóxido (Fernández *et al.*, 2009).

Al contrario de los agentes penetrantes, los no penetrantes presentan peso molecular elevado, no son permeables a la membrana espermática y estos favorecen la deshidratación de la célula por la creación de gradientes osmóticos, entre ellos se encuentra la sacarosa, dextrosa, glucosa, fructosa y proteínas (Stornelli *et al.*, 2005; Ávila *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2019).

Actualmente se conocen tres métodos de congelación espermática que han sido constantemente modificados con el fin de tener mejores resultados con respecto a

la funcionalidad espermática, y se ordenan conforme a la velocidad de congelamiento de la muestra. En primer lugar, se tiene a la congelación lenta que es la metodología más empleada por permitir la conservación de grandes volúmenes de semen, sin embargo, debido al descenso de la temperatura en tiempos prolongados, las células son susceptibles a presentar mayor daño por la formación de cristales de hielo además de que el procedimiento se considera largo y tedioso (Riva *et al.*, 2016).

La criopreservación rápida consiste en una rápida deshidratación celular mediante elevadas concentraciones de crioprotector, en la metodología generalmente se emplea el uso de pastillas de hielo seco sobre las que se colocan perlas de la muestra mezclada con el crioprotector que después serán almacenadas directamente en bancos de nitrógeno líquido, con esta técnica se genera menor cantidad de daño en el espermatozoide comparado con la técnica convencional o lenta (Berrios y Sánchez, 2011; Mahdavinez *et al.*, 2022).

El tipo de criopreservación más reciente y que sigue bajo investigación y pruebas es la vitrificación. Es ultra rápida e implica la exposición directa de los espermatozoides a nitrógeno líquido teniendo de ventaja el evitar la formación de cristales de hielo intracitoplasmáticos al elevar la viscosidad de los líquidos intra y extracelulares y pasar de estado líquido a sólido, además que es una metodología rápida, más sencilla y no requiere de instrumental sofisticado para su ejecución (Berrios y Sánchez, 2011).

A pesar de las grandes ventajas que brinda la criopreservación de espermatozoides, varios autores han señalado que puede generar diversos daños y alteraciones en los espermatozoides, entre los principales están la alteración proteico-lipídica de la membrana, disminución en la fluidez de la membrana, daño mitocondrial, deterioro en la integridad del ADN así como roturas de cadena sencilla y doble de esta molécula y aumento en la producción de **especies reactivas de oxígeno** (ERO) provocando **estrés oxidante** (OS), dichas alteraciones afectan a su vez la morfología, la vitalidad y la motilidad del espermatozoide viéndose comprometida

su capacidad para una fecundación exitosa (Berrios y Sánchez, 2011; Riva *et al.*, 2016).

Mencionado con anterioridad, la criopreservación también es utilizada posterior a la técnica de lavado seminal de una muestra infectocontagiosa, siendo por VHC, VHB o VIH con el fin de permanecer almacenadas durante la comprobación serológica de la muestra y poder utilizarla con seguridad de que no se encuentre infectada al momento de una ICSI (Donnelly *et al.*, 2001).

5.8 El virus de la inmunodeficiencia humana

El VIH, es un virus de ARN perteneciente a la familia de virus Retroviridae agrupado en el género *Lentivirus* e identificado por primera vez en 1983. Con relación a su primera transmisión a humanos se cree que ocurrió durante el siglo pasado, entre 1920 y 1940 (Woolhouse y Brierley, 2018). Se originó de varios eventos de transmisión zoonótica de virus de inmunodeficiencia de primates no humanos en chimpancés de África Central (VIH-1) y monos mangabey negros de África occidental (VIH-2) (Van Heuvel *et al.*, 2022).

Las infecciones por *Lentivirus* generalmente se caracterizan por un avance crónico de la enfermedad con un periodo largo de latencia clínica y una constante replicación viral, así como afectación al sistema nervioso central (Fanales-Belasio *et al.*, 2010). La transmisión del VIH requiere de una exposición directa a sangre en presencia de daños en la piel o durante el contacto sexual a través de las superficies mucosas siendo esta la principal fuente de contagio, además se puede transmitir por exposición materno-infantil y el uso compartido de agujas (Shaw *et al.*, 2012).

Fanales-Belasio y colaboradores (2010) destacan que los aislados del VIH actualmente se agrupan en dos tipos, el VIH-1 agente principal mundial del SIDA y VIH-2 que se encuentra restringido a algunas regiones de África occidental y central. Ambos pueden ocasionar SIDA, sin embargo, la enfermedad del sistema nervioso central es más frecuente en la infección por VIH-2, también se ha encontrado que el VIH-2 parece ser menos virulento en comparación con el VIH-1, por lo que, el curso de la infección tarda más en convertirse en SIDA.

En cuanto a la forma en que el virus se replica, primero hay que tomar en cuenta la estructura del virión y su genoma. El genoma de ARN (ARNg) es de un aproximado de 9 kb con la capacidad de sintetizar las 15 proteínas requeridas para la replicación, abarca nueve ORFs (marco de lectura abierto), y está bordeado por sus LTRs (repeticiones terminales largas), mismas que contienen información del promotor viral de expresión génica, integración y transcripción inversa y que se encuentra dividido en los elementos U3, R y U5. Seguido de esta sección del genoma, están presentes los genes estructurales *gag* y *pol* que codifican proteínas estructurales centrales [proteínas de matriz (MA), de cápside (CA) y nucleocápside (NC)] y subunidades de enzimas virales [proteasa (PR), transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN)] respectivamente (Van Heuvel *et al.*, 2022).

Existe un tercer gen estructural, sin embargo, este se ubica después de tres de los cuatro genes accesorios Vpr, Vif y Vpu que influyen en la producción de partículas virales, posterior a estos tres genes mencionados, se encuentra el último gen estructural *env*, encargado de codificar dos glicoproteínas, la unidad de superficie (SU) gp120-SU, y la de transmembrana (TM) gp41-TM, localizadas en la envoltura **Figura 8** (Van Heuvel *et al.*, 2022).

Ubicados por encima del gen *env*, como se puede apreciar en la **Figura 7**, se tienen los genes reguladores *tat* que funge de activador transcripcional y *rev* cuya función es la de factor de exportación nuclear, transportando el ARN viral al citoplasma de la célula huésped, estos genes son indispensables para la replicación viral. Continuo a los genes mencionados se ubica el cuarto gen accesorio *nef*, que según menciona Van Heuvel y colaboradores (2022) eleva la infectividad del VIH y regula la baja de proteínas encontradas en la célula huésped.

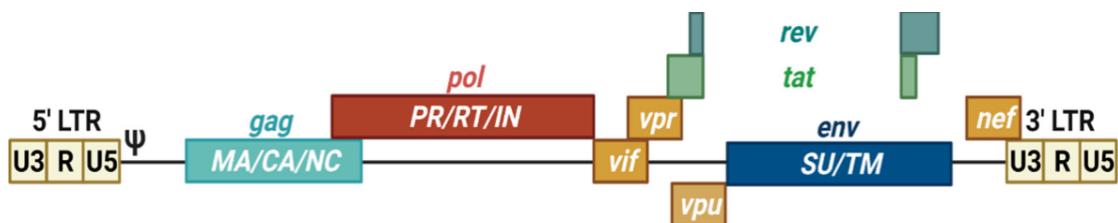


Figura 7. Genoma del virus del VIH. Representación esquemática de la organización del genoma del virus (tomada de Van Heuvel *et al.*, 2022).

El virión maduro del VIH presenta una forma esférica con diámetro aproximado de 120 nm, una membrana de bicapa lipídica que contiene proteínas de la célula huésped y complejos de heterodímeros de glicoproteínas compuestos por trímeros de gp120 de superficie y gp41 de transmembrana unidas entre sí, la membrana envuelve al núcleo formado por la proteína de matriz. Posterior a la matriz se encuentra la cápside viral con forma de cono, como se puede apreciar en la Figura 8. La cápside viral almacena dos copias de ARNg monocatenario que se encuentran estabilizadas por proteínas de la nucleocápside, las enzimas virales integrasa y transcriptasa inversa. Además, en el virión también se tiene almacenadas la enzima proteasa y la proteína accesoria Vpr, mismas que son necesarias durante el proceso de maduración del nuevo virión (Van Heuvel *et al.*, 2022).

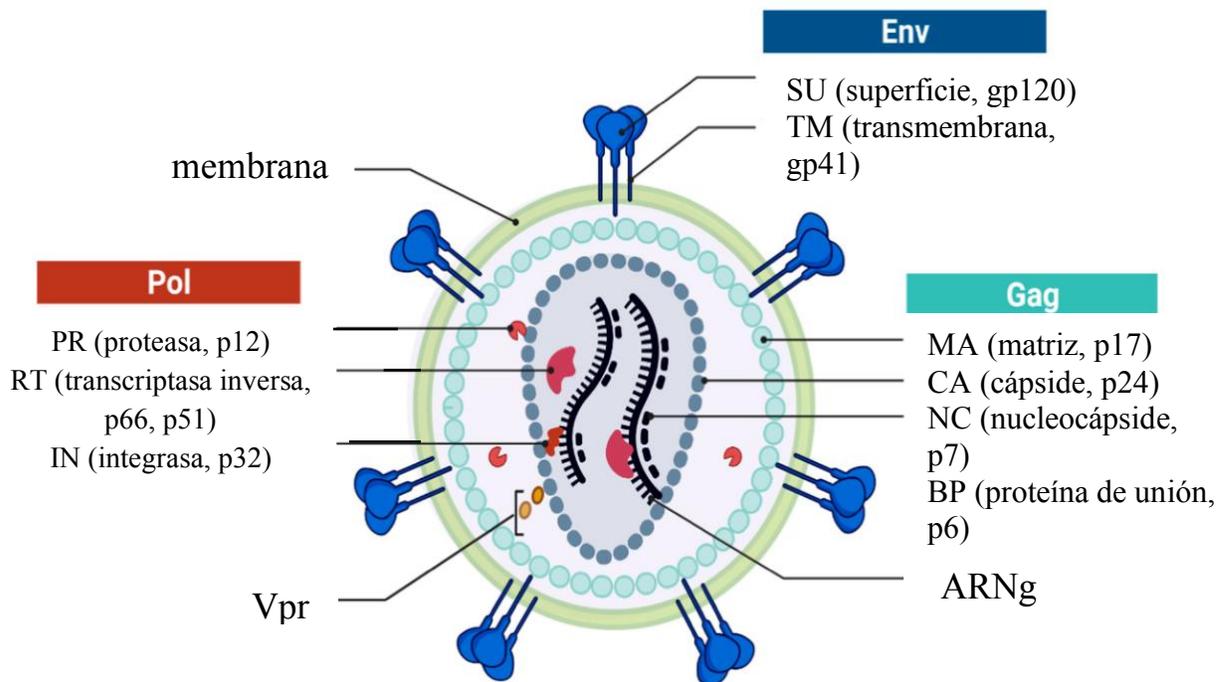


Figura 8. Estructura del virión maduro del virus del VIH. Representación esquemática de las partes, enzimas y proteínas que componen y almacena el virión maduro del VIH (modificada de Van Heuvel *et al.*, 2022).

5.8.1 Replicación del virus

Fenales-Belasio y colaboradores (2010), resumen en seis pasos el ciclo replicativo del VIH. En primer lugar, está la unión y entrada del virus a la célula, el segundo paso es su desensamble en el interior de la célula huésped, el tercero es la transcripción inversa, después la integración del provirus resultante de esa transcripción. El quinto paso es la síntesis y el ensamblaje de las proteínas virales y la gemación.

La infección comienza mediante la unión de las glicoproteínas gp120-SU y gp41 ubicadas en la membrana del virión al receptor primario CD4 que se encuentra expresado en el 60 % de los linfocitos T, en monocitos/macrófagos, eosinófilos, etc., y los co-receptores de quimiocina CCR5 mismos que se expresan en los macrófagos, células dendríticas y linfocitos T activados. Garolla y colaboradores (2013), resaltan que CCR5 ha sido detectado en la parte de la superficie periacrosomal del espermatozoide pudiendo estar involucrado en la adhesión del VIH-1 al mismo; así como CXCR4 que se encuentra expresado en varias células incluyendo los linfocitos T.

Esta acción genera cambios conformacionales en los trímeros de la membrana permitiendo así la fusión del virión con la membrana de la célula huésped para liberar la cápside viral en el citoplasma. Ya en el citoplasma del huésped, la cápside viaja al poro nuclear a través de los microtúbulos con ayuda de la dineína y cinesina-1 de los mismos **Figura 9** (Ferguson *et al.*, 2002; Fanales-Belasio *et al.*, 2010).

Llegando al poro nuclear, la cápside viral interactúa con proteínas del mismo, para de esta manera ingresar al núcleo donde se desensambla parcialmente e inicia la transcripción inversa del ARN_v viral a dsADN proviral. Este proceso de transcripción inversa y su posterior integración son elementos fundamentales y característicos de la replicación de los retrovirus para evitar su erradicación quedando de forma permanente en la célula huésped infectada, ya que se crea una copia de ADN de doble cadena del genoma de ARN viral a partir de la transcripción inversa y la integración guarda la copia de ADN en el genoma de la célula infectada. Debido a

las propiedades ya mencionadas, el VIH se convierte en una infección latente y de por vida (Van Heuvel *et al.*, 2022; Christensen *et al.*, 2020).

Respecto al proceso característico del retrovirus denominado transcripción inversa, comienza con la transferencia de primera hebra y la síntesis del ADN monocatenario, en este paso la ADN polimerasa que es dependiente de ARN/ADN y la ARNasa H, ambas partes de p66-RT, desempeñan un papel fundamental. El ADN monocatenario o ssDNA por sus siglas en inglés, se hibrida en el extremo 3' del genoma viral dando continuación a la síntesis de ADN de cadena negativa. Posterior a este paso, se da la transcripción de la cadena positiva de ADN finalizando la síntesis de dsADN (Van Heuvel *et al.*, 2022).

Lo que confiere al virus del VIH su variabilidad genética es el evento de cambio de plantilla durante la transcripción inversa al encontrarse propenso a errores, presentando una alta frecuencia de recombinación genética y la elevada tasa de mutación de la transcriptasa inversa, eventos que resultan en poblaciones de VIH heterogéneas en secuencia confiriéndoles la capacidad de evadir de forma más eficiente la respuesta inmune de las células huésped y desarrollar resistencia a los tratamientos antirretrovirales (Freed, 2002).

Una vez concluido el proceso de transcripción inversa, el ADN viral producido es transportado al núcleo donde la enzima integrasa incorpora el ADN viral resultante de la transcripción inversa, en el ADN cromosómico del huésped o provirus. Este ADN integrado o provirus se va a comportar como un gen celular, este proceso al igual que la transcripción inversa son pasos esenciales durante la replicación de los retrovirus (Freed, 2002).

Al integrarse el provirus en el cromosoma de la célula huésped comienza la síntesis de ARN virales que codifican el complemento de proteínas estructurales, reguladoras y accesorias requeridas para la replicación del virus. Estos ARNm producidos son transportados fuera del núcleo, para llevar a cabo la traducción y la producción de las proteínas virales dando comienzo al proceso de ensamblaje del



virus que tiene lugar en la membrana plasmática de la célula infectada, evento principalmente controlado por el gen *gag* (Freed, 2002).

Después de su llegada a la membrana plasmática de la célula huésped, dos ARN_g virales, *gag*, *pol*, *env* y *vpr* se pliegan permitiendo el empaquetamiento del virus para formar partículas inmaduras de VIH-1 en la membrana celular, mismas que después brotan y son liberadas de la célula huésped. Al ser liberadas comienzan su proceso de maduración durante el cual la proteasa escinde los genes de *gag* y *pol* en sus subunidades MA, CA y NC y las enzimas virales PR, RT y IN. Concluido este paso los viriones pueden comenzar con un nuevo ciclo de replicación infectando una nueva célula huésped (Van Heuvel *et al.*, 2022).

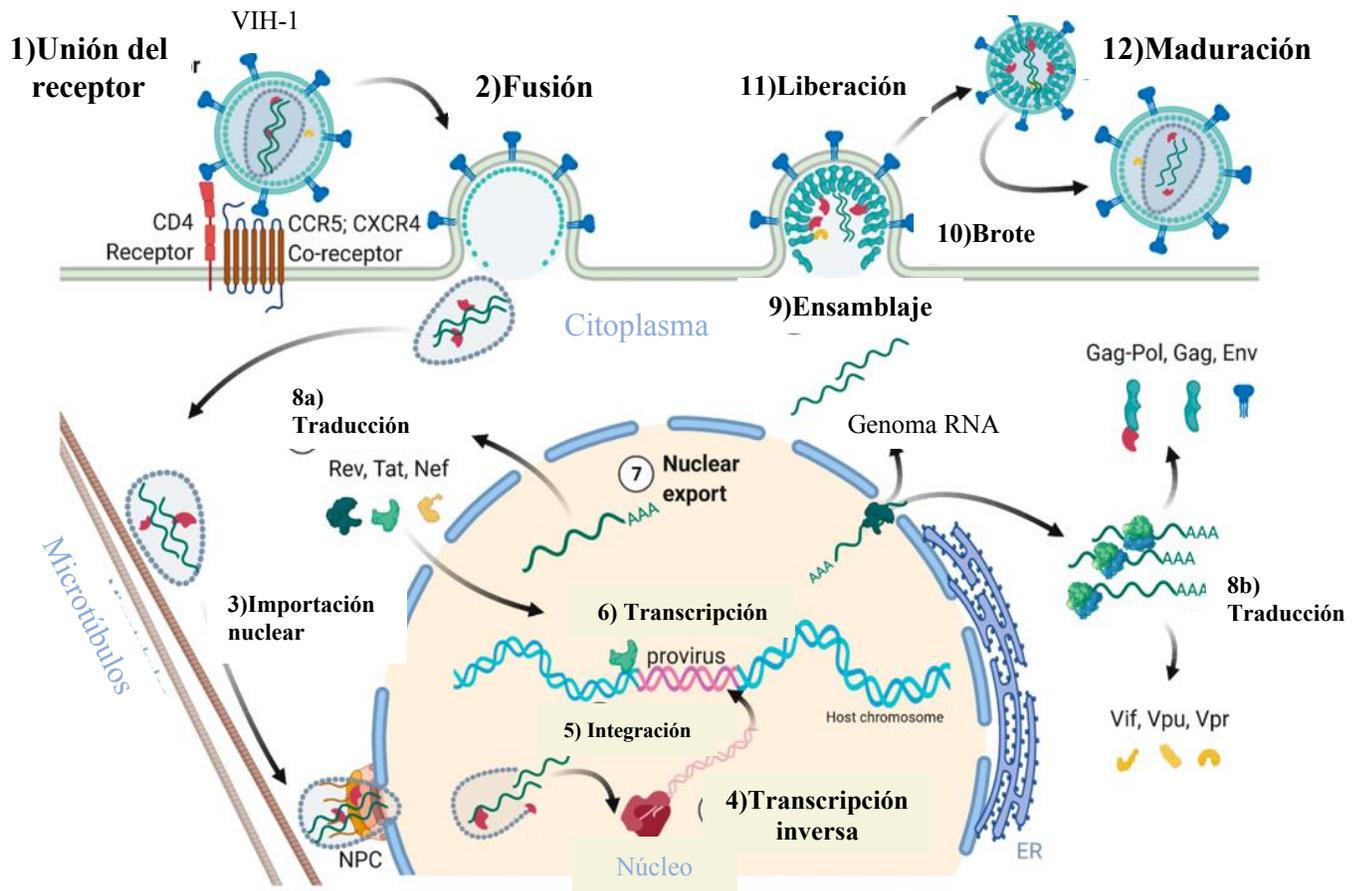


Figura 9. Representación del ciclo de replicación del virus del VIH. Se observa de forma resumida el ciclo de replicación del virus del VIH, así como las enzimas y proteínas involucradas en cada paso (tomada y modificada de Van Heuvel *et al.*, 2022).

A consecuencia de que la mayoría de las personas infectadas con el VIH son principalmente jóvenes en edades reproductivas, se han diseñado técnicas de preparación del espermatozoides para aquellos hombres seropositivos a VIH que tengan deseo de generar descendencia, una de las técnicas es el lavado de espermatozoides en conjunto con técnicas de selección espermática.

5.9 Métodos de diagnóstico del virus de VIH

Dependiendo del estadio de la enfermedad, el VIH tiene una sintomatología variada. Fenales-Belasio y colaboradores (2010) establecen que a partir de los pocos días de haber sido expuesto al virus y hasta unas semanas después, la mayoría de las personas padecen síntomas parecidos a los de una gripe o mononucleosis, en los que destacan la fiebre, erupción maculopapular, úlceras orales, linfadenopatía, dolor en las articulaciones y músculos, faringitis, fatiga, pérdida del apetito y del peso.

Los síntomas pueden variar entre las personas, incluyendo más graves y durante un periodo de tiempo más largo especialmente en aquellos en los que la infección aguda tiende a progresar de forma más rápida a SIDA.

Además, después de la infección por cualquiera de las vías, los anticuerpos o antígenos tardan de 4 a 8 semanas en ser detectables en sangre, tiempo que varía dependiendo del individuo, a este periodo entre la infección por VIH y el momento en que los anticuerpos son detectables se conoce como periodo de seroconversión o de ventana (Fenales-Belasio *et al.*, 2010).

Los métodos de diagnóstico y serología del VIH más comúnmente utilizados es ELISA para la detección de antígenos o anticuerpos contra el virus VIH 1 y 2 en la sangre, y Western-Blot de test de confirmación en caso de positividad; otra prueba es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que detecta el ARN o el ADN del virus del VIH y su ventaja es que determina si la infección por VIH está presente aun cuando la prueba de anticuerpos es incierta (García *et al.*, 2001).

Hay que tomar en cuenta que el recuento típico de células T CD4+ en una persona saludable se encuentra entre las 500 a 1200 células/ μ L, por lo que en una persona infectada con VIH esta concentración de linfocitos T CD4+ disminuye drásticamente dependiendo también del transcurso de la infección ya que Van Heuvel y colaboradores (2022) mencionan que conforme progresa la infección hasta convertirse en SIDA, el recuento celular disminuye a menos de 100 células T CD4+ por μ L.

Como consecuencia del descenso en el recuento celular de los linfocitos T CD4+ los individuos infectados por VIH son más propensos a desarrollar más enfermedades y neoplasias malignas por infecciones oportunistas como *Candida albicans*, por lo que una persona infectada sin tratamiento suele fallecer después de un periodo de latencia de 10 años (Van Heuvel *et al.*, 2022). En la actualidad hay tratamientos que permiten el manejo de la infección por VIH aumentando la calidad de vida de estos pacientes.

5.10 Terapia antirretroviral

Durante los últimos la terapia antirretroviral de gran actividad (HAART por sus siglas en inglés), ha incrementado su aplicación, porque es considerado el tratamiento más eficaz en los pacientes infectados por VIH-1, con un aproximado del 73 % de personas infectadas los que cuentan con acceso a este (Savasi *et al.*, 2018).

La terapia antirretroviral es capaz de reducir significativamente los niveles de carga viral en la sangre y en el semen, sin embargo, se ha reportado que algunos hombres mantienen una cierta concentración viral en su semen a pesar de mostrar una carga viral indetectable en el plasma sanguíneo debido al tratamiento. En la actualidad existen más de 40 antirretrovirales aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos, FDA (Semprini y Fiore, 2004).

Ahmad y colaboradores (2011) plantean que esta terapia combina inhibidores de la transcriptasa inversa de nucleósidos (NRTI), impidiendo la síntesis de la cadena de ADN proviral e inhibidores de la proteasa (PI) que evitan la formación de las

proteínas estructurales del VIH, mismas que son necesarias para la maduración de las partículas virales. Es de importancia mencionar que el tratamiento de HAART, al ser un tratamiento de por vida, requiere de una variación en la combinación de los medicamentos para prevenir y evitar la resistencia del virus al medicamento durante la monoterapia.

No obstante, la reducción en los niveles de carga viral y una mejora en la calidad de vida de los pacientes tratados con HAART, diversos autores han reportado una asociación entre los efectos adversos de la terapia antirretroviral y la toxicidad mitocondrial, disminución de la generación de energía mitocondrial y cambios en el metabolismo de los espermatozoides, así como el posible aumento en la fragmentación del ADN espermático (Kehl *et al.*, 2011; Savasi *et al.*, 2018).

Dicho lo anterior, se ha demostrado reducción en la motilidad progresiva de los espermatozoides posterior a los tratamientos antirretrovirales, particularmente con el uso de inhibidores de los nucleósidos de la transcriptasa inversa (Frainais *et al.*, 2010).

Debido a esto, es importante tener en cuenta al evaluar la calidad seminal, si el paciente se encuentra bajo terapia antirretroviral, la duración de la terapia y el estado inmunológico del paciente.

5.11 Técnica de lavado de espermatozoides

El lavado de esperma se desarrolló aproximadamente hace 32 años en Milán, Italia y su aprobación ética, así como el inicio del primer ciclo de tratamiento comenzó en 1999 (Nicopoullos *et al.*, 2010). Esta técnica consiste en eliminar el plasma seminal y las células no espermáticas, sitios donde se pueden encontrar distintas bacterias y virus, tal es el caso de la hepatitis B, hepatitis C y el VIH, por lo que se reduce el riesgo de seroconversión de la mujer. Ya que, en los hombres infectados con VIH-1 y que están bajo el tratamiento de HAART pueden no tener niveles detectables de ARN viral en el plasma, sin embargo, el virus puede estar presente en células encontradas en el semen y transmitirse sexualmente (Garolla *et al.*, 2013).

En 2007, Bujan y colaboradores reportan que el lavado seminal utiliza tres pasos, el primero es una migración por medio de centrifugación de espermatozoides en gradientes de densidad que pueden ir de 40 hasta 90 % para separar los espermatozoides móviles que se encuentren libres de VIH de las células no espermáticas; por ejemplo, los leucocitos, que se encuentren infectados. El segundo paso es el lavado del sedimento migrado o pellet y el tercero es el uso de “swim-up”, que según indica su nombre, consiste en el nado de los espermatozoides hacia arriba. Estos tres pasos dependen de la calidad de la muestra seminal y forman parte de las técnicas de selección en reproducción asistida.

Las **técnicas de reproducción asistida** y su tecnología en conjunto con el lavado de semen minimizan el daño potencial de seroconversión a la mujer sana y a su vez, garantiza una buena tasa de fertilidad (Semprini y Fiore, 2004). Estas técnicas involucran una preparación espermática con la que se busca recuperar la población de espermatozoides de mejor calidad con una morfología adecuada y motilidad funcional, preservando el ADN y no induciendo disfunciones mediante la producción de ERO.

El procesamiento de centrifugación en gradientes de densidad y el swim-up son las técnicas más utilizadas en la actualidad para la preparación de semen, mediante ellas se eliminan a los espermatozoides de mala calidad e inmóviles, también células como bacterias, leucocitos, eritrocitos, sustancias tóxicas y ERO. Es de importancia resaltar que estas técnicas no pueden ser consideradas 100 % efectivas en la remoción de agentes infecciosos como el virus de la hepatitis B o el VIH (Le *et al.*, 2022).

La técnica de selección espermática a utilizar va a depender de la calidad de la muestra seminal en fresco observada mediante un seminograma. Además de los gradientes de densidad y el “swim-up”, otra opción a realizar en caso de que la muestra sea de muy buena calidad y que tenga alto rendimiento de espermatozoides es el lavado simple, que consiste únicamente en la adición de

medio HTF o “wash”, sin embargo, con esta técnica no se eliminan los detritus y los leucocitos (Le *et al.*, 2022).

Si la muestra se considera normozoospermica mediante el análisis seminal, se emplea un “swim-up” directo en el que los espermatozoides se seleccionan por su capacidad de atravesar mediante el nado, el plasma seminal y llegar al medio colocado sobre la muestra en fresco y en una posición aproximada de 45°. Le y colaboradores (2022) destacan que uno de los inconvenientes que tiene esta técnica es que los espermatozoides y células redondas (leucocitos y células espermáticas inmaduras) permanecen en contacto con los espermatozoides de mejor calidad provocando incremento en las ERO, pese a ello, el “swim-up” permite obtener espermatozoides con buena motilidad y bajos niveles de fragmentación del ADN.

El último método para el lavado de espermatozoides de muestras con VHB, VHC y el VIH es la técnica de gradientes de densidad, que de forma similar al “swim-up”, es un método eficaz con la finalidad de obtener espermatozoides de alta calidad con respecto a motilidad para las técnicas de reproducción asistida. Consiste en la centrifugación de la muestra seminal sobre gradientes de densidad de sílica coloidal cuyo volumen y cantidad de gradientes va a variar dependiendo de la calidad de la muestra (Le *et al.*, 2022).

Posterior al procesamiento de los espermatozoides, y su obtención después de la migración de estos en un gradiente de densidad o mediante “swim up”, deben congelarse o criopreservarse a fin de comprobar la ausencia de ARN viral del VIH-1 mediante la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) con el fin de prevenir la infección de la pareja y del feto (Frainais *et al.*, 2010).

5.12 Requisitos para realizar el lavado de espermatozoides

Los pacientes seropositivos a VIH que acuden a centros de reproducción asistida para un lavado de espermatozoides primero deben cumplir con ciertos

requerimientos que son definidos por cada clínica y el médico que realizará el procedimiento.

Principalmente se solicita que presenten un buen pronóstico vital y control de la enfermedad, que se encuentren bajo terapia antirretroviral altamente activa, estos dos primeros requerimientos deben provenir del médico que se ha estado encargando del control de la infección desde los inicios de la misma y, que a su vez, se siga cumpliendo con el tratamiento y los controles, también deben contar con serologías vigentes con un tiempo no mayor a 6 meses de hepatitis B, hepatitis C, RPR (VDRL) cuya función es detectar sífilis y, de VIH del paciente y su pareja. Además de un reporte del estatus de salud del paciente por parte del infectólogo y un reporte de la carga viral, cultivos recientes de la muestra, así como el análisis reciente de semen realizado en algún laboratorio de reproducción humana (Nicopoullos *et al.*, 2011).

Por parte de la clínica donde se va a realizar el lavado de la muestra de semen del paciente seropositivo a VIH, el médico y el biólogo debe informar detalladamente sobre en qué consiste el procedimiento y eficiencia de este debido hay 10 % de probabilidad de que el resultado sea positivo posterior al lavado. De igual forma se debe solicitar la firma del paciente para el consentimiento informado previamente firmado por el médico tratante y el biólogo (Nicopoullos *et al.*, 2011).

De resultar la muestra positiva a VIH mediante la prueba PCR posterior al lavado seminal, se repite el lavado con una nueva muestra de semen y si el resultado es negativo la muestra puede utilizarse para el procedimiento de reproducción asistida. Igualmente se informa al paciente que, al tener resultado positivo en la prueba de embarazo, se hará seguimiento de este hasta el momento que se tenga un recién nacido vivo mediante pruebas de VIH a los 3, 6 y 9 meses antes del parto y 3, 6, 9 y 12 meses después del nacimiento del bebé (WHO, 2020).

5.13 Bioseguridad y manejo de residuos

Para un adecuado manejo de muestras infectocontagiosas, en este caso muestras seminales seropositivas a VIH, se debe tomar en cuenta medidas preventivas y protocolos para evitar casos de infecciones en el laboratorio, por el riesgo que representa el manejo de estas muestras biológicas (Richmond y McKinney, 2002).

En el diario oficial de la federación se encuentra publicada la norma para la regulación del manejo de los Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI), la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, cuyo objetivo es el proteger al personal de salud de los riesgos relacionados con el manejo de residuos y a la población que pudiera estar en contacto con los mismos dentro y fuera de las clínicas y laboratorios (Secretaría de Salud, 2003).

Entre las medidas de prevención para reducir riesgo de infección se recomienda a) reducir al mínimo el número de trabajadores que puedan estar expuestos, b) adopción de medidas seguras para la obtención, manipulación y procesamiento de la muestra en el lugar de trabajo, así como c) la utilización de medios seguros para el almacenamiento y evacuación de los residuos por los trabajadores (García *et al.*, 2001).

Dentro del área de trabajo, se prohíbe la ingesta de alimentos y bebidas, así como el consumo de tabaco; a los trabajadores que manipulen la muestra se les debe proveer ropa de protección adecuada, tal es el caso de guantes, mascarillas, protección ocular, batas y calzado cerrado, mismos que deberán quitarse, lavarse y descontaminarse en caso de contaminación por el agente biológico (García *et al.*, 2001).

Los equipos de seguridad incluyen gabinetes de seguridad biológica nivel 2, que proporcionan seguridad a la manipulación de muestra, al operador y al ambiente. Además de recipientes cerrados y otros controles de ingeniería cuyo fin es eliminar o minimizar las exposiciones a materiales biológicos. Los gabinetes de seguridad biológica o campanas de bioseguridad proporcionan contención de salpicaduras o

aerosoles infecciosos que suelen generarse durante los procedimientos biológicos (Richmond y McKinney, 2002).

Para la manipulación de muestras seminales en las que se conoce la presencia de alguna infección como el VIH, la campana biológica de Nivel 2 es la recomendada cuando se trabaja con sangre derivada de humanos, fluidos corporales, tejidos o líneas celulares primarias humanas donde se puede desconocer la presencia de agentes infecciosos (Richmond y McKinney, 2002).

La campana biológica de nivel 2 está diseñada con flujo de aire de entrada a una velocidad de 75 a 100 lfpm para proteger al personal, cuenta con flujo laminar vertical hacia abajo con filtro de aire de partículas de alta eficiencia (HEPA por sus siglas en inglés) para la protección del producto y flujo de escape filtrado con HEPA para la protección ambiental (Taylor *et al.*, 2019).

En el manejo y eliminación de residuos debe tomarse en cuenta que todos estos residuos con sangre o fluidos se deben considerar como potencialmente infecciosos y eliminarlos según las normas establecidas por el centro o por el diario oficial de la federación en el 2003 apegándose a la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

Tabla 1.

Tabla 1. Recipientes para envasarlos diferentes Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos		
TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FÍSICO	ENVASADO / COLOR
Punzocortantes: Agujas de jeringas desechables, navajas, lancetas, agujas de sutura, bisturís y estiletes de catéter. EXCEPTO MATERIAL DE VIDRIO ROTO DE LABORATORIO	Sólidos	Recipientes rígidos de polipropileno/ ROJO 

<p>No anatómicos: Materiales de curación empapados en sangre o líquidos corporales</p>	<p>Sólidos</p>	<p>Bolsas de plástico/ ROJO</p> 
<p>Materiales desechables: que contengan secreciones pulmonares de pacientes sospechosos de tuberculosis o sospecha/ diagnóstico fiebres hemorrágicas o enfermedades emergentes</p>	<p>Sólidos</p>	<p>Bolsas de plástico/ ROJO</p> 
<p>Sangre líquida, y sus derivados excluyendo sangre seca</p>	<p>Líquida</p>	<p>Recipiente hermético/ ROJO</p> 
<p>Muestras para análisis de laboratorio excluyendo orina y excremento</p>	<p>Líquido</p>	<p>Recipiente hermético/ AMARILLO</p> 

<p>Materiales desechables usados para el cultivo de agentes infecciosos.</p>	<p>Sólidos</p>	<p>Bolsas de plástico/ ROJO</p> 
---	----------------	--

El tipo de recipiente y el color que debe tener dependiendo del residuo que va a ser desechado (Secretaría de Salud, 2003).

El manejo inadecuado de los residuos por parte del personal encargado aumenta el riesgo para las personas dentro de la cadena de control de estos procesos, así como para la población en general, por lo tanto, para disminuir los riesgos, el personal encargado de la recolección de los residuos dentro de la clínica o el laboratorio debe estar capacitado para su manipulación y conocer los riesgos que esto implica (Secretaría de Salud, 2003).

5.14 Calidad seminal y criterios según la OMS

Estudiar la calidad seminal en las últimas décadas se ha vuelto muy relevante debido a la evidencia que demuestra el declive de los parámetros seminales convencionales, presentado en la edición del 2010 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2010). Estos sirven de guía en los laboratorios de andrología a la hora de evaluar la calidad seminal.

Podemos denominar semen al líquido eyaculado tras un orgasmo que consta de una suspensión concentrada de espermatozoides almacenados en los epidídimos mezclada con secreciones de la próstata, las vesículas seminales, las glándulas bulbouretrales y las glándulas de Cowper. La eyaculación puede dividirse en dos fases, la emisión y la expulsión (Cohen y Taylor, 2009).

La emisión inicia por los centros reflejos en la médula espinal que van a estimular la contracción del músculo liso en la próstata, vesículas seminales, conducto deferente y el epidídimo provocando la acumulación del semen en la uretra bulbar.

Mientras este proceso ocurre, se cierra el esfínter involuntario en la base de la vejiga impidiendo la salida de orina. La expulsión que es la segunda fase de este proceso se caracteriza por las contracciones del suelo pélvico y de los músculos bulbocavernosos que permiten la salida del semen por la uretra (Broseta *et al.*, 2021).

Los parámetros mínimos para evaluar la calidad del semen incluyen el volumen seminal, pH, concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática, estos últimos son considerados los cuatro los parámetros más importantes. Sus medidas o valores pueden variar dependiendo de la edad, patologías asociadas, temperatura corporal y ambiental, sector gráfico y estilo de vida de los pacientes (Espinoza *et al.*, 2010).

La evaluación de la muestra se debe realizar transcurridos 30 minutos o no más de una hora después de su obtención, comenzando con el análisis de los parámetros macroscópicos entre los que se encuentran la licuefacción, la viscosidad, el volumen, el color que de acuerdo con Egeberg y colaboradores (2018) es blanco ligeramente amarillento y el pH mayor o igual a 7.2.

Dentro de los parámetros microscópicos se evalúa la concentración espermática, la motilidad, vitalidad, la morfología y la concentración de leucocitos; para considerar a la muestra como normal o con "Normozoospermia" se deben cumplir con los límites de referencia establecidos por WHO en el 2020 encontrados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Límites de referencia según Who en 2010 y 2020		
Parámetro seminal	WHO 2010 5th	WHO 2020 6th
Volumen (mL)	1.5	1.4
Recuento de espermatozoides (mill)	15	16
Recuento total de espermatozoides (mill/mL)	39	ε 39
Motilidad total (%)	40	42
Motilidad progresiva (%)	32 (Grado a+b)	30
Vitalidad (%)	58	54
Morfología formas normales (%)	4	4
Leucocitos (mill/mL)	<1.0	< 1.0

Límites de referencia para los parámetros seminales establecidos por la Organización Mundial de la Salud en su quinta y sexta edición.

De acuerdo con los límites de referencia presentados en la **Tabla 2**, la OMS ha designado términos médicos a los casos en que los parámetros seminales no cumplen con estos criterios, por ejemplo, si al evaluar la concentración espermática se obtiene un conteo menor de 16 millones de espermatozoides por cada mL del volumen del eyaculado se denomina oligozoospermia, en casos más severos en los que la concentración es menor a 100,000 espermatozoides/mL se denomina criptozoospermia y al no encontrar algún espermatozoide en la muestra se denomina azoospermia (Egeberg *et al.*, 2018; Corona *et al.*, 2019).

La motilidad progresiva debe dar un porcentaje de 30 % o mayor al ser evaluada, si se presenta un valor inferior a este límite de referencia se nombra astenozoospermia; con relación a la vitalidad, un porcentaje inferior al 54 % es considerado como necrozoospermia (Egeberg *et al.*, 2018).

El porcentaje de espermatozoides normales al evaluar la morfología debe ser igual o superior al 4 %, de no ser así se considera que la muestra tiene teratozoospermia,

este padecimiento y la motilidad progresiva reducida presenta una correlación con un elevado índice de fragmentación del ADN espermático (O'Brien y Zini, 2005).

5.15 Estrés oxidante y Especies Reactivas de Oxígeno

La generación de oxidantes conocidos como ERO en el tracto reproductor masculino se ha convertido en tema de investigación relevante por su potencial tóxico en niveles elevados sobre la función y calidad espermática, siendo uno de los factores más involucrados en la etiología de la infertilidad. Cabe resaltar que las ERO juegan un papel importante en diversos eventos del gameto masculino, participando en su maduración, en la capacitación espermática, motilidad, reacción acrosómica y en la hiperactivación, de igual forma en la fusión de membranas durante la fecundación, a pesar de ello, un desequilibrio en la homeóstasis entre la producción de ERO y la capacidad antioxidante total del semen se produce el daño denominado estrés oxidante (OS) (Sikka, 2001; Argawal y Saleh, 2002).

El potencial tóxico que tienen las ERO sobre los espermatozoides es a causa del elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados que conforman a las membranas plasmáticas, destacada la capacidad de los peróxidos de los ácidos grasos para detener de forma veloz y permanente la motilidad espermática, así como un citoplasma con un contenido citosólico limitado de factores antioxidantes, en adición, los espermatozoides poseen mecanismos reducidos de detección y reparación de daños en el ADN, convirtiéndose en un gran problema ya que las ERO tienen la capacidad de atacar tanto el ADN nuclear como el mitocondrial (Esteves *et al.*, 2020; Aitken *et al.*, 2022; Farkouh *et al.*, 2022).

Varios autores resaltan también que las ERO generan daño en el núcleo espermático por medio de la modificación de bases y creando sitios abásicos, a consecuencia de que las bases adenina, citosina y timina son muy sensibles al daño oxidante, así como entrecruzamientos de protaminas y roturas de cadenas de ADN. El nivel de daño generado en el material genético y en la calidad seminal por la

producción de ERO va a depender del tiempo de exposición a ellas, al estrés oxidante, y de la capacidad antioxidante (Esteves *et al.*, 2020; Farkouh *et al.*, 2022).

Se ha demostrado que el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son los principales responsables en la peroxidación lipídica de las membranas, donde el H_2O_2 es el que tiene mayor impacto en la función espermática, entre otros oxidantes. Los espermatozoides también pueden generar al peroxinitrito ($ONOO^-$), radicales peroxilo (ROO^{\bullet}), radicales alcoxilo (RO^{\bullet}), hidroperóxidos orgánicos ($ROOH$) y al radical libre óxido nítrico (NO^{\bullet}), implicados también en provocar daño en los espermatozoides cuando se encuentran en niveles elevados (Aitken *et al.*, 2022).

Una de las principales fuentes de ERO es el sistema mitocondrial del espermatozoide. Argawal y Saleh (2002) consideran que otro evento que genera incremento son los ciclos repetidos de centrifugación en la muestra utilizados durante las técnicas de selección espermática, siendo más influyente el tiempo de centrifugación en contraste con la fuerza de la centrífuga para la producción de las especies reactivas de oxígeno y, por lo tanto, incremento en la fragmentación del ADN espermático.

Es bien conocido que la fragmentación del ADN espermático está relacionada con problemas en la fertilización, una mala calidad embrionaria, aumento en las tasas de aborto espontáneas y reducción en las tasas de embarazo después de un procedimiento de reproducción asistida (Evenson 2011; Savasi *et al.*, 2018), por consiguiente, se recomienda la evaluación de la fragmentación del ADN previo a estos procedimientos.

Mediante el espermograma se puede identificar si el espermatozoide de la muestra tiene algún daño en su ADN, debido a que los espermatozoides con morfología anormal y bajos niveles de motilidad tienen más daño al ADN, para confirmar si la muestra presenta fragmentación del ADN y la magnitud de este se debe realizar un ensayo que permita dicha evaluación.

5.16 Fragmentación del ADN espermático

Debido a que la fertilización y el desarrollo embrionario dependen parcialmente del estado en que se encuentre la arquitectura molecular del espermatozoide, en la actualidad los estudios sobre las causas de infertilidad en las parejas se han ido centrando en las pruebas de integridad del ADN del espermatozoide. Lolo y colaboradores en 2022 mencionaron que aproximadamente el 25 % de los hombres diagnosticados como infértiles, presentan un índice de fragmentación del ADN (DFI por sus siglas en inglés) > 30 %.

El daño del ADN espermático se puede definir como cualquier cambio químico en la estructura normal del ADN y a la fragmentación del ADN espermático (SDF) tal es el caso de roturas de cadena sencilla o doble, daño particularmente frecuente en muestras seminales de pacientes infértiles (Yao *et al.*, 2020). Al tratarse de un problema relevante para conseguir una adecuada fertilización, se tienen identificadas las principales causas y mecanismos por las que se da este fenómeno, sin embargo, aún no se han determinado con exactitud. Se han propuesto diversos factores para la etiología de la fragmentación del ADN (**Figura 10**), entre estos se encuentran causas externas, que pueden potenciar estos efectos como la contaminación, el tabaquismo, una temperatura testicular elevada o patologías entre las que destacan el varicocele, procesos inflamatorios o cáncer, por mencionar algunos, así como empaquetamiento anormal de la cromatina por fallos en el intercambio correcto de la fracción histónica por las protaminas.

De igual forma se ha propuesto como uno de los principales contribuyentes de la fragmentación del ADN, al aumento de las ERO y el OS que se ha encontrado que en pacientes infectados con VIH-1 pueden reducir la calidad seminal (Quintero-Vásquez *et al.*, 2015; Savasi *et al.*, 2018).

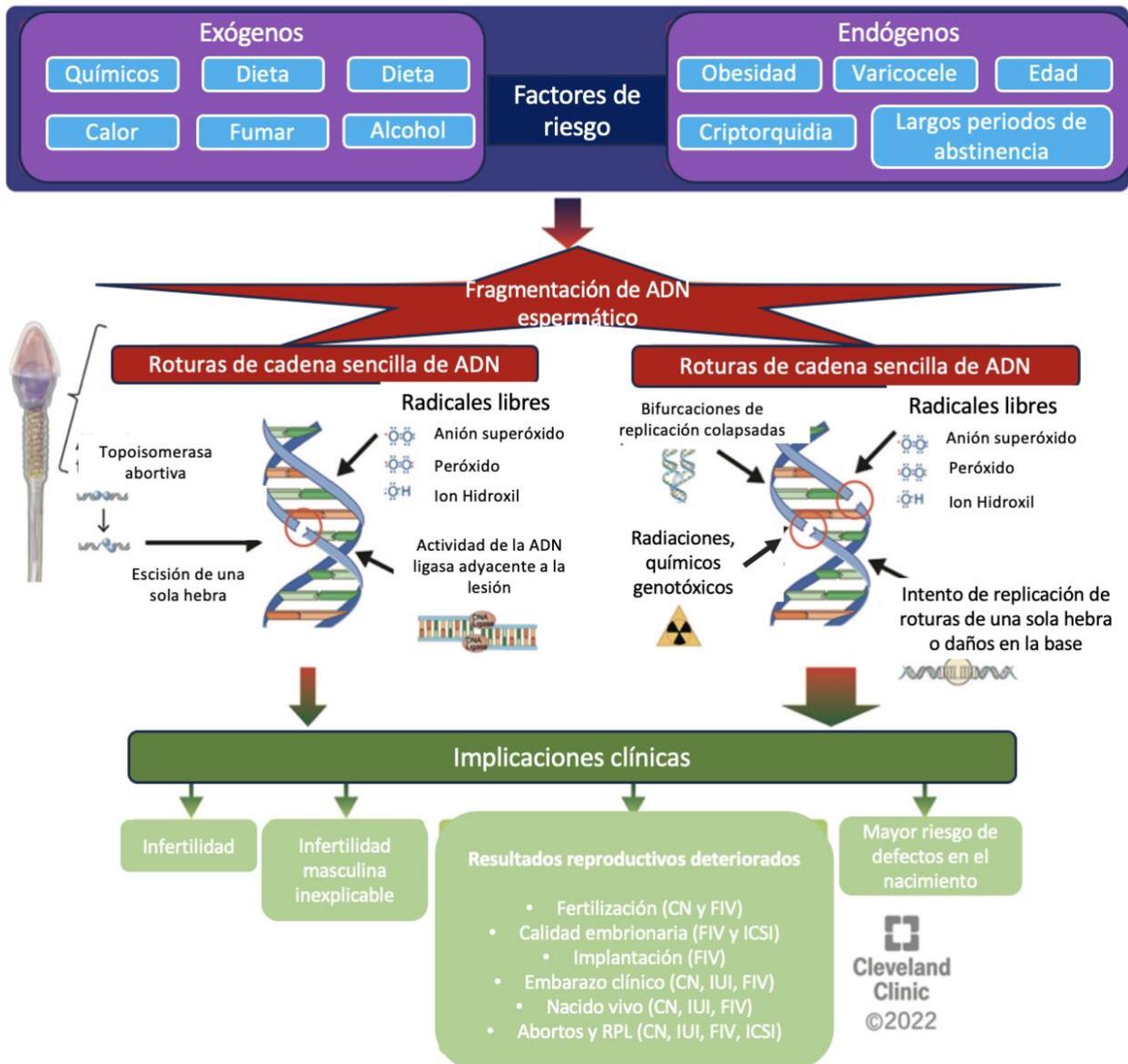


Figura 10. Factores de riesgo y mecanismos moleculares que desencadenan la fragmentación del ADN. Se observan los principales factores de riesgo exógenos y endógenos que pueden inducir a roturas en cadena sencilla o doble, así como las implicaciones clínicas (modificada de Farkouh *et al.*, 2022).

Se han desarrollado diferentes técnicas cuyo fin es evaluar la presencia de fragmentación del ADN, en general se han dividido a estas técnicas mediante las estrategias que se emplean. En primer lugar, se incluyen las metodologías encargadas de marcar las roturas de cadena sencilla y doble como el ensayo TUNEL (Cortés *et al.*, 2007).

Después tenemos las que miden la capacidad que posee la cromatina para desnaturalizarse ante diferentes tratamientos, entre ellos, el ensayo cometa, el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) y la prueba de **dispersión de cromatina espermática** (SCD), siendo las mencionadas las más utilizadas en los laboratorios de andrología y reproducción asistida (Sadeghi *et al.*, 2016).

5.16.1 Técnicas de evaluación de la fragmentación del ADN

5.16.1.1 Electroforesis unicelular en gel

El ensayo cometa o electroforesis unicelular en gel es uno de los métodos más sencillos para evaluar roturas de ADN de cadena simple o doble en el espermatozoide, su principio se basa en la separación de hebras rotas de ADN bajo la influencia de un campo eléctrico según la carga y el tamaño de las hebras. La prueba es nombrada así por la apariencia de cometa que se observa en el microscopio de fluorescencia de los fragmentos del ADN rotos de cadena simple y doble teñidos que migran hacia la cola del cometa, mientras que el ADN intacto permanece en la cabeza del cometa (Burlison, 2012).

Como señalan Farkouh y colaboradores (2022), en esta prueba los espermatozoides migran en una matriz de agarosa en la que se promueve una lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfidrido encontrados en las protaminas del espermatozoide, un ejemplo es el DTT (dithiothreitol) en condiciones alcalinas permitiendo que durante la electroforesis las hebras rotas del ADN migren hacia el ánodo.

El ensayo cometa alcalino, en el que se utiliza un tampón de pH >13 es usado con mayor frecuencia en los laboratorios de andrología por su capacidad de detectar las roturas de cadena sencilla con mayor sensibilidad en comparación con el ensayo neutro. Para calcular la cantidad promedio de fragmentación del ADN se realiza el análisis de 100 espermatozoides o cometas individuales (Albert *et al.*, 2016).

5.16.1.2 Ensayo TUNEL

El marcaje de extremos de desoxinucleotidil transferasa terminal (dUTP) o TUNEL (por sus siglas en inglés), es una de las técnicas más utilizadas para la evaluación de fragmentación del ADN, además de que está incluida en el manual de la OMS. Una de las principales fuentes de fragmentación detectable por esta técnica parece ser el daño de los radicales libres a través de ERO y la apoptosis abortiva (Carrell y Aston, 2013).

Es un método directo que mide las roturas de cadenas de ADN espermático *in situ*, cuantifica los extremos 3'-OH libres de ADN que sirven como cebadores, se marcan con bromodesoxiuridina (BrdU) en una reacción catalizada por una polimerasa de ADN independiente del molde denominada desoxinucleotidil transferasa terminal (TDT), y utiliza un marcador fluorescente para detectar roturas del ADN en una o ambas cadenas (Cankut *et al.*, 2019).

Agarwal *et al.*, (2016) refieren que cuantos más sitios de rotura de cadenas de ADN se encuentren, más etiquetas se incorporarán dentro de la célula.

La técnica TUNEL comúnmente es utilizada en casos de oligospermia severa por su sensibilidad y especificidad, sin embargo, Frainais y colaboradores en 2010 señalan que esta técnica sólo explora la etapa final de la apoptosis, por lo que puede subestimar el daño real del ADN en el espermatozoide.

5.16.1.3 Ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA)

El SCSA, se propuso en 1980 por Evenson y colaboradores por primera vez y desde entonces ha sido utilizado con el fin de detectar daños en el ADN espermático evaluando de esta forma la fertilidad masculina (Zhang *et al.*, 2022).

El principio de esta técnica se basa en que la cromatina con fragmentación del ADN tiene una mayor afinidad a desnaturalizarse *in situ* frente a un tratamiento con calor o solución ácida. Por lo tanto, los espermatozoides son tratados con una solución

de pH bajo de 1.2, según establecen Farkouh y colaboradores (2022), con el fin ya previamente mencionado, de desnaturalizar la cromatina y permitir la tinción.

En la metodología se incluye el uso del fluorocromo naranja de acridina por su capacidad de intercalarse entre la doble cadena de ADN como un monómero que, tras su posterior excitación, emite color rojo o anaranjado al incorporarse al ADN de cadena sencilla o monocatenario y fluorescencia verde si se introduce en ADN bicatenario (Cortés *et al.*, 2007).

Después de la tinción de las células, se analizan de 5000 a 10,000 espermatozoides rápidamente por muestra mediante citometría de flujo. El DFI se representa por el grado de fluorescencia roja encontrado en la muestra, esta fluorescencia representa el porcentaje de espermatozoides con ADN roto. Según remarcan Esteves y colaboradores (2020), en el caso del SCSA, se considera un índice de fragmentación espermática alto cuando el valor de porcentaje es mayor del 20 a 25 %, el cual es relacionado con problemas de fertilidad.

5.16.1.4 Ensayo de dispersión de cromatina espermática (SDC)

Como ya es bien sabido, el ADN de los espermatozoides está seis veces más compactado y se encuentra organizado en bucles con un menor tamaño en comparación con las células somáticas, estos bucles compactados por las protaminas confieren estabilidad y rigidez a la estructura de la cromatina.

La técnica de Halosperm se basa en el ensayo SCD, en el cual se evalúa la susceptibilidad del ADN espermático a la desnaturalización ácida. Se basa en el principio de que los bucles de ADN intactos se expanden después de dicha desnaturalización formando halos de dispersión que se liberan después de la eliminación de las proteínas nucleares, los nucleoides de espermatozoides con ADN fragmentado no muestran halo de dispersión o el halo es mínimo (Cankut *et al.*, 2019).

Está conformada principalmente de tres pasos, el primero es la inclusión de los espermatozoides en la matriz de agarosa proporcionando un sustrato inerte similar



a una suspensión para la manipulación celular, el segundo es la incubación en una solución ácida de desenrollado de ADN disolviendo la doble hélice en presencia de daños al ADN seguida de lisis que sirve para eliminar las proteínas nucleares, como paso final se realiza la deshidratación en baños de alcohol etílico y tinción para su visualización bajo microscopía de campo claro (WHO, 2020).

El ensayo de SCD permite la identificación de roturas monocatenarias (SSB) y dobles (DBS), además, una de las ventajas de la técnica es que, en comparación con la técnica TUNEL y SCSA, no requiere de equipos avanzados lo que permite una fácil aplicación en diversos laboratorios de andrología. Se analizan de 300 a 500 espermatozoides, al microscopio de campo claro (Hamilton y Assumpção, 2019; Esteves *et al.*, 2020; Farkouh *et al.*, 2022).

Para determinar el índice de fragmentación espermática en la muestra, se realiza una clasificación dependiendo del tamaño del halo que como se mencionó anteriormente, aquellos espermatozoides con presencia de halo grande y mediano se consideran normales o sin fragmentación, y tal se aprecia en la **Figura 11** los espermatozoides con halo pequeño, sin halo o sin halo y degradados se clasifican como espermatozoides con fragmentación.

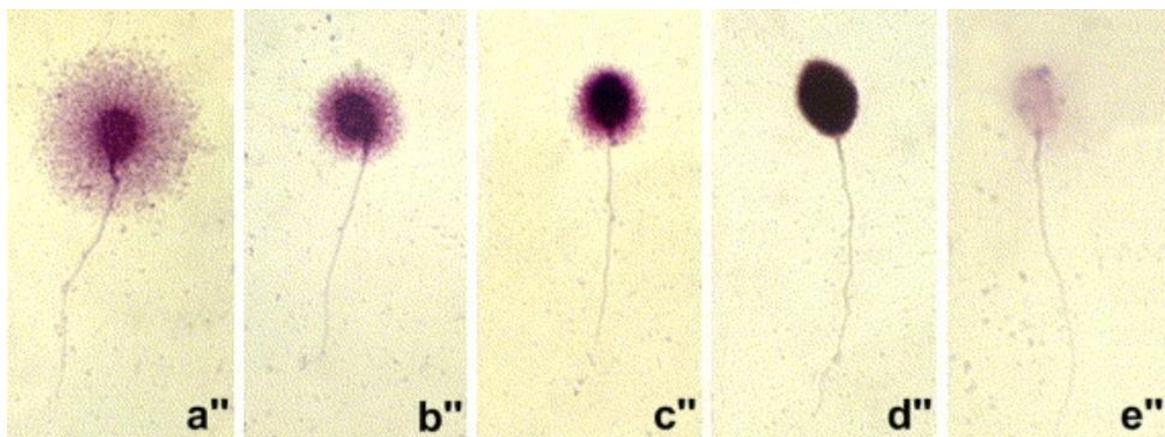


Figura 11. Clasificación espermática de acuerdo con la integridad del ADN mediante SCD. Se observa los distintos tamaños de halo que se pueden apreciar bajo el microscopio, y se distinguen los espermatozoides a) sin fragmentación con halo grande, b) halo mediano, así como c) los fragmentados con halo pequeño, d) sin halo y e) el degradado (modificada de Fernández *et al.*, 2005).

Al concluir el conteo y evaluación de los halos, con la siguiente fórmula se calcula el índice de fragmentación de ADN espermático (Evenson *et al.*, 2006).

$$\text{DFI (\%)} = \frac{\text{halo pequeño} + \text{sin halo} + \text{degradado}}{\text{Total de espermatozoides analizados}} \times 100$$

De los métodos de evaluación de daño al ADN del espermatozoide, se ha demostrado que la técnica SCD que se encarga de evaluar la ausencia de daño en el material genético del espermatozoide, ayuda a predecir la fertilidad de forma más eficiente y en adición, su aplicación e interpretación es más sencilla y rápida, sin embargo es de importancia mencionar que no presenta diferencias estadísticas en comparación con las técnicas anteriormente mencionadas con respecto a la evaluación de la fragmentación del ADN espermático (Farkouh *et al.*, 2022).

5.17 Control de la fragmentación del ADN espermático

Se han diseñado distintas estrategias para poder reducir o controlar los niveles elevados de fragmentación del ADN espermático, las cuáles varían dependiendo de los antecedentes del paciente, y de esta forma mejorar los resultados reproductivos en procedimientos de reproducción asistida.

Teniendo en cuenta que se ha detectado un DFI significativamente mayor en los hombres con sobrepeso con índice de masa corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, se propone la pérdida de peso como una estrategia para la reducción de fragmentación del ADN espermático debido a que Mir y colaboradores en 2018 reportaron disminución en los niveles de SDF después de que pacientes infértiles recibieran un programa de pérdida de peso con dieta y ejercicio durante un periodo de 12 semanas.

Como ya se mencionó con respecto al varicocele, existe una asociación de este padecimiento con el aumento de la SDF en comparación con pacientes sanos, incremento relacionado principalmente con el OS, por consiguiente, varios estudios informaron que la varicolectomía puede disminuir los niveles de SDF y por

consiguiente mejora las tasas de embarazo clínico y nacidos vivos después de un procedimiento de reproducción *in vitro* (Farkouh *et al.*, 2022).

Considerando que el OS es uno de los principales contribuyentes en el aumento en los niveles de SDF, se sugiere el tratamiento con diferentes antioxidantes con el fin de mejorar la integridad del material genético espermático y, de manera similar a las estrategias anteriormente mencionadas, para mejorar los resultados de fertilidad (Muratori *et al.*, 2019).

6. JUSTIFICACIÓN

Las muestras seminales de pacientes seropositivos a VIH pueden presentar anomalías en los parámetros seminales, como son la concentración, la motilidad y la morfología de los espermatozoides, estos dos últimos están relacionados con la calidad e integridad del material genético en los mismos. El lavado seminal de pacientes seropositivos a VIH es una técnica de reproducción asistida de alta complejidad que permite seleccionar espermatozoides normales y disminuir la carga viral de los mismos, para posteriormente utilizarlos en distintos procedimientos como el ICSI. Además del grado de infección del VIH, se puede presentar durante el proceso y manipulación de la muestra alteraciones y daños en la cromatina espermática, uno de ellos es conocido como fragmentación del ADN. En la actualidad en muchos países, incluyendo a México, no se tiene información de los daños y alteraciones que se presentan en el ADN al utilizar este procedimiento. Por lo anterior, el presente estudio es importante para contar con más información sobre estas técnicas de reproducción asistida, con el fin de incrementar el éxito reproductivo de los ciclos de ICSI y del desarrollo embrionario y posterior nacido vivo sano y que los pacientes seropositivos a VIH estén informados de las alternativas reproductivas con las que cuentan.

7. HIPÓTESIS

Debido a que el VIH en los varones afecta la calidad seminal mediante anomalías en los parámetros seminales evitando su reproducción, entonces se espera ,que, al incorporar el análisis de la fragmentación del ADN al inicio y final del lavado de semen, se obtenga más información de la integridad del ADN del espermatozoide posterior al lavado de semen de VIH y de este modo se obtengan espermatozoides de buena calidad, negativos al VIH y con bajos niveles de fragmentación del ADN espermático.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

Evaluar la calidad e integridad espermática pre y post-lavado en muestras seminales seropositivas a VIH.

8.2 Objetivos particulares

- ♥ Evaluar la calidad seminal de pacientes seropositivos a VIH.
- ♥ Determinar el daño al ADN espermático en fresco y post-lavado de muestras seropositivo a VIH.
- ♥ Determinar una posible correlación entre la calidad seminal y la fragmentación de ADN en muestras seropositivo a VIH.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Comité de bioética y consentimiento informado

El estudio es parte integral del proyecto “Correlación de la madurez de la cromatina, estrés oxidante, fragmentación del ADN y metabolismo espermático con las tasas de fertilización, desarrollo embrionario, formación de blastocisto, tasa de embarazo y recién nacidos vivos en varones infértiles sometidos a técnicas de reproducción asistida” con el Dictamen del Comité Hospitalario de Bioética COMBIOETICA 09CHB10620171023, código asignado por el comité HISPCHB21-01. El cual se lleva a cabo en las instalaciones de la clínica HISPAREP, laboratorios de Andrología e *in vitro*. Se tiene el consentimiento informado para llevar a cabo el análisis de muestras de semen en fresco y post-lavado y técnicas de reproducción asistida en parejas serodiscordantes para VIH (varón VIH +) y protocolo de investigación (Anexo 1).

9.2 Obtención de la muestra y análisis seminal

Se evaluaron 61 muestras seminales de pacientes portadores de VIH con deseos reproductivos que acudieron a la clínica HISPAREP del Hospital Español, durante el año 2022 e inicios del año 2023. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para llevar a cabo la prueba lavado de semen de VIH. Los pacientes con 3 a 5 días de abstinencia sexual obtuvieron su muestra seminal por masturbación en un recipiente de boca ancha estéril. A todos los pacientes se les solicitó un doble eyaculado para llevar a cabo el procedimiento.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de andrología para pruebas especiales, donde todo el equipamiento es exclusivo para este tipo de estudios, como la campana biológica de nivel 2.

Se colocaron las muestras en la incubadora a 36 °C durante 30 minutos para que se licuaran y posteriormente se evaluaron el volumen de semen, pH, concentración, viabilidad, motilidad y morfología, de acuerdo con los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud en 2020, con ayuda de un microscopio de

contraste de fases. Previo al lavado seminal se tomó una alícuota de la muestra de 200 μL para el análisis de fragmentación del ADN.

Previo a realizar el examen microscópico de las muestras se evaluaron los parámetros macroscópicos transcurridos los 30 minutos, siendo la licuefacción, viscosidad, aspecto, volumen y pH los parámetros evaluados.

- **Licuefacción y viscosidad:** Este parámetro se evaluó a los 30 minutos de recolectada la muestra, y en caso de que a los 60 minutos la muestra siguiera sin licuar, la licuefacción se realizó mecánicamente haciendo pasar la muestra a través de una pipeta hasta completarla. La viscosidad fue evaluada de igual forma con una pipeta mediante la observación de la forma en que el semen goteaba, siendo normal al detectarse una caída gota por gota y de no ser así, para reducirla se empleó el mismo método utilizado para la licuefacción.
- **Aspecto:** Para la evaluación del aspecto se tomó en cuenta el color que presentaba la muestra, considerándose normal al ser color blanquecino amarillento, también se consideró la opacidad/ transparencia de la muestra y la presencia de cuerpos gelatinosos.
- **Volumen:** El volumen se midió mediante una pipeta graduada.
- **pH:** Para la determinación del pH se utilizaron tiras reactivas de papel ColorpHast de Merck que cuentan con rango de sensibilidad de 6.4 a 8.0, sobre la tira se colocó una gota de la muestra seminal, se esperó a que esta cambiara de color y se comparó con la tira de calibración para obtener el pH.

9.2.1 Evaluación de concentración espermática y motilidad

Transcurridos los 30 minutos de licuefacción a 36 °C, se tomó con ayuda de una pipeta de precisión una alícuota de 5 a 7 μL y se colocó en la cámara Makler que se encuentra conformada por una cuadrícula de 1 mm^2 dividida en 100 cuadros y



con una profundidad de 10 μL , para el análisis de la motilidad y ver la concentración espermática de la muestra utilizando un microscopio de contraste de fases a 200X.

De la cuadrícula subdividida en 100 cuadros, se contó la cantidad de espermatozoides presentes en 10 cuadros; de acuerdo con Cardona y colaboradores (2008), el número total de espermatozoides contados es la concentración final expresada como 1×10^6 espermatozoides/mL. Siguiendo los criterios del manual de la OMS se consideró una concentración normal si se registraron 16 millones de espermatozoides/mL.

Con la muestra en la cámara Makler se analizó la motilidad de los espermatozoides evaluando 100 espermatozoides por muestra y se clasificaron en progresivos, no progresivos e inmóviles según lo establecido por WHO (2020). Al finalizar la evaluación, se informó el porcentaje de espermatozoides en cada una de las categorías, se consideró como motilidad normal cuando el porcentaje de móviles progresivos fue $\geq 30\%$.

9.2.2 Evaluación de la vitalidad de los espermatozoides

La vitalidad se analizó tomando una alícuota de 5 μL de la muestra en fresco y se colocó en un portaobjetos, después se tomaron 5 μL de eosina al 5 % y se homogeneizó con la gota de semen en el portaobjetos, después se cubrió con un cubreobjetos de 22 x 22 mm evitando la formación de burbujas, el portaobjetos con la tinción se evaluó con el microscopio de contraste de fases bajo un aumento de 400X y contraste de fases ph2.

Se evaluaron 100 espermatozoides con ayuda de un contador de células para laboratorio y se registró el número de células teñidas de rojo o rosa correspondiendo a los espermatozoides muertos, y el número de células con cabeza blanca correspondientes a los espermatozoides vivos. Finalizada la evaluación se informó el porcentaje de espermatozoides vivos considerando este como normal cuando el valor fue $\geq 54\%$.



9.2.3 Evaluación de la morfología de los espermatozoides

Para la evaluación de la morfología de los espermatozoides, se colocó una alícuota de 5 µL en un portaobjetos para realizar un frotis con ayuda de otro portaobjetos, el frotis se dejó secar al aire para teñirlo con la técnica rápida Diff-Quick. Posterior al proceso de tinción, se evaluó la tinción bajo el microscopio con contraste de fases a 1000X con aceite de inmersión, se analizaron todas las partes que conforman al espermatozoide (cabeza, pieza media y cola), así como la presencia de residuo citoplasmático, se observó que las partes fueran normales y se informó el porcentaje de espermatozoides normales y con defectos en cualquiera de sus componentes utilizando los criterios estrictos de Kruger para dicha evaluación sugeridos en el manual de WHO.

Las muestras se consideraron con morfología normal cuando se obtuvo un porcentaje $\leq 4\%$ de espermatozoides sin registro de alguna anomalía o normales. Concluida esta evaluación se determinó el **índice de teratozoospermia (TZI)**, el **índice de anormalidades múltiples (MAI)** y el **índice de deformidad espermática (SDI)** de cada muestra.

Los índices mencionados fueron calculados con las siguientes fórmulas:

- TZI:

$$\frac{\text{Anormalidades de cabeza} + \text{pieza media} + \text{cola} + \text{residuo citoplasmático}}{\text{Total de espermatozoides anormales}}$$

- MAI:

$$\frac{\text{No. de anormalidades de cabeza} + \text{No. de defectos en pieza media} + \text{No. de defectos en cola}}{\text{Total de espermatozoides anormales}}$$

- SDI:

$$\frac{\text{No. de anormalidades de cabeza} + \text{pieza media} + \text{cola} + \text{residuo citoplasmático}}{\text{Total de espermatozoides evaluados}}$$



9.3 Lavado seminal

Después de haber revisado los parámetros seminales de las muestras se realizó el lavado seminal con el fin de reducir la carga viral y obtener los espermatozoides de mejor calidad. Para esto, a la muestra seminal se le añadieron 6 μ L de medio para eliminar la viscosidad de la muestra con ayuda de una pipeta.

El tipo de lavado y selección espermática se realizó dependiendo de la calidad que presentó la muestra posterior a su evaluación, ya que en caso de encontrarse una muestra en muy mal estado (concentración < 16 millones, motilidad < 30 %, morfología < 4 % y además presencia de detritos) únicamente se realizó un lavado doble con medio "Wash", para este paso, la muestra ya con medio se pasó completa a un tubo de centrifuga cónico y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos, terminada esta primera centrifugación se desechó el sobrenadante y se agregó más medio homogeneizándolo con el botón celular, después se repitió la centrifugación (2000 rpm x 10 minutos). Se retiró el sobrenadante dejando el botón sobre el que se agregaron de 150 a 300 μ L de medio "Wash" para selección espermática, se dejó la muestra en una posición de 45° para el "swim-up" en calor durante 2 horas o 2 horas y media, de igual forma determinado por la calidad de la muestra, transcurrido el tiempo se recuperó la cantidad de medio agregado y se colocó en tubo cónico (Falcón) de 5 mL. Para finalizar, se colocó una alícuota de 5 μ L en la cámara Makler para contar la concentración y motilidad espermática post lavado y ver la calidad de la muestra recuperada.

Las muestras con una mejor calidad fueron procesadas como se mencionó anteriormente, agregando medio para romper viscosidad, previo a pasar la muestra al tubo de centrifuga cónico, se agregaron los gradientes de densidad discontinuos al 40 , 75 y 90 %, la cantidad de gradientes, así como el grosor de estos fueron determinados dependiendo de la calidad que presentara cada muestra, después de la centrifugación (2000 rpm durante 10 minutos) se recuperó el botón y se agregó a otro tubo cónico con 4 mL de medio para lavar los gradientes mediante centrifugación de 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante dejando medio muy pegado al botón celular y se agregaron de 200 a 300 μ L de medio para

dejarlo en “swim-up” en calor durante 1 a 2 horas, al concluir el tiempo se recuperó la cantidad de medio agregado y se colocó en tubo Falcón de 5 mL, de igual forma se volvió a evaluar la concentración y motilidad de los espermatozoides después del lavado.

Concluido el lavado seminal y previo a la congelación de la muestra, se recuperó una alícuota de 200 μ L para el análisis de fragmentación del ADN, además de una alícuota extra de 7 μ L para la prueba molecular, en este caso, una PCR en tiempo real. Los 7 μ L obtenidos se agregaron en 500 μ L de medio “Wash” en un tubo Falcon de 5 mL, mismo que fue etiquetado con el nombre del paciente y sellado con papel Parafilm para su transportación al laboratorio de molecular.

El área de trabajo se desinfectó después de cada protocolo, para evitar cualquier posible contaminación cruzada y se dejó en luz ultravioleta 30 minutos para eliminar cualquier partícula infectocontagiosa.

9.4 Criopreservación de la muestra

A la muestra recuperada del lavado seminal se le agregó la cantidad de medio requerida para tener 500 μ L de muestra y añadir 500 μ L de crioprotector penetrante y no penetrante TEST-yema (TYB) con el fin de tener una solución 1:1; esta solución se homogeneizó con una pipeta Pasteur con precaución de no formar burbujas, una vez homogeneizada la muestra se comenzó con la congelación.

La técnica de congelación utilizada para la muestra de los pacientes con VIH fue por congelación rápida, para ello, previamente fueron rotulados con el nombre del paciente, un tubo Goblet y la escalerilla para su almacenamiento, de igual forma se llenó con nitrógeno líquido un recipiente de acero inoxidable y se elaboró una pastilla de CO₂ o hielo seco por medio de un adaptador (**Figura 12**), misma que con ayuda de un lápiz de punta diamante para laboratorio se le hicieron unos agujeros de un aproximado de 5 mm de diámetro y de profundidad, como se muestra en la **Figura 13a** para colocar las perlas de la solución.



Figura 12. Tanque de CO₂ con adaptador para pastilla. El CO₂ sale a presión y comienza a llenar el adaptador hasta formar la pastilla de hielo seco.

Teniendo lista la pastilla y utilizando una pipeta Pasteur, se colocaron alícuotas de aproximadamente 50 μ L de la mezcla del semen con crioprotector en cada agujero para la formación de las perlas (**Figura 13b**). Posterior a que las perlas perdieran el brillo y adquirieran un color crema opalescente, se depositaron dentro del tubo Goblet previamente introducido en el recipiente con nitrógeno líquido. Terminando el proceso de congelación de toda la muestra, el tubo Goblet se cerró y se colocó en la escalerilla, introduciéndose en el tanque de nitrógeno líquido que se encuentra a temperatura de -196 °C para su almacenamiento.



a



b

Figura 13. Técnica de congelación rápida. En a) elaboración de agujeros sobre pastilla de hielo seco con ayuda de un lápiz de punta diamante y en b) perlas de la muestra seminal completado el tiempo de congelación con color crema opalescente.

9.5 Análisis de fragmentación del ADN nuclear espermático

Para realizar el análisis de fragmentación del ADN espermático se utilizó la prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD) con el kit Halosperm. Esta prueba requiere de una concentración de 10 a 15 millones de espermatozoides por mililitro para poder realizarse, por lo que la muestra recolectada se diluyó con medio Wash dependiendo de la concentración de la muestra en fresco.

Los tubos Eppendorf incluidos en el kit que contienen la agarosa de bajo punto de fusión se colocó en un baño de agua a 95-100 °C durante 5 minutos o hasta que se encontró derretida y se mantuvo a 37 °C para evitar su gelificación. Con ayuda de una pipeta de precisión se tomaron 25 µL de la muestra de semen diluida y se mezclaron gentilmente evitando la formación de burbujas con la agarosa a 37 °C. De la mezcla de semen y agarosa se pipetearon alícuotas de 25 µL en los portaobjetos pretratados con agarosa incluidos en el kit Halosperm y se cubrieron con un cubreobjetos de 22 x 22 mm evitando la formación de burbujas.

Los portaobjetos se colocaron en una placa fría durante 8 minutos para comenzar la solidificación de la agarosa, transcurrido este tiempo, los portaobjetos se

colocaron en el refrigerador sobre una placa fría durante 8 minutos, concluido este tiempo, se dejaron los portaobjetos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se retiró el cubreobjetos deslizándolo de forma suave para no desprender la agarosa.

Retirado el cubreobjetos, se preparó la solución desnaturalizante, para la cual se mezclaron 80 μ L del contenido de la solución de desnaturalización ácida, incluida en el kit Halosperm, en 10 mL de agua destilada. Los portaobjetos se sumergieron de forma horizontal en la solución desnaturalizante durante 7 minutos. Posterior a la solución desnaturalizante, se sumergieron en 10 mL de solución de lisis durante 25 minutos, después los portaobjetos se colocaron en agua destilada durante 5 minutos para enjuagar los restos de la solución de lisis.

Los portaobjetos se colocaron en contenedores con alcohol etílico al 75 y 90 % durante 2 minutos en cada uno para la deshidratación de la muestra y se dejaron secar al aire para realizar la tinción. La tinción de los portaobjetos se realizó con el kit de tinción rápida DiffQuik, primero se sumergieron de forma rápida en el fijador y se dejó secar al aire, después se sumergieron durante 10 minutos en cada solución colorante.

Una vez teñidos los portaobjetos, se analizaron en un microscopio a 1000X con aceite de inmersión, se evaluaron 500 espermatozoides y se consideraron aquellos que tuvieron halo grande o mediano como espermatozoides sin daño en el ADN y los que presentaron halo pequeño, no tuvieron halo o estaban degradados (**Figura 11**) como espermatozoides con fragmentación en el ADN esto representado en la figura (WHO, 2020).

9.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se creó una base de datos en el programa Excel donde se incluyeron los parámetros seminales de las muestras y los niveles de fragmentación del ADN. Los datos cuantitativos se expresaron como media \pm DEM, y fueron analizados con el paquete estadístico R commander versión 4.2.2 (2022),



mediante ANOVA de un factor, complementada por la prueba Tukey para determinar el nivel de significancia estadística entre los grupos. Para evaluar la posible correlación entre la calidad seminal y la fragmentación del ADN espermático se aplicó el análisis de correlación de Pearson. Se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue menor o igual al 0.05.

10. RESULTADOS

Se analizaron 61 muestras de semen provenientes de pacientes seropositivos a VIH del laboratorio de andrología de la clínica de reproducción asistida HISPAREP del Hospital Español. Estas muestras fueron analizadas por medio de un seminograma pre-lavado y post-lavado y fueron clasificadas por rangos de edad, por etiología y por nacionalidad.

10.1 Clasificación por edades

En la **Tabla 3** se observan los parámetros seminales de las muestras en fresco agrupadas por edad (G1-G4) y la comparación de los mismos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la morfología, específicamente en el porcentaje de espermatozoides normales y anormales entre los grupos 2 y 4 siendo menor el porcentaje de espermatozoides normales en el G4 comparado con el G2, y a su vez, incremento en el porcentaje de espermatozoides anormales en el grupo 4 con respecto al grupo 2. En el resto de los parámetros seminales evaluados, no hubo diferencias significativas entre los grupos.



Tabla 3. Análisis seminal en fresco

PARÁMETROS SEMINALES	MENORES DE 30 AÑOS (G1) (n= 4)	31 a 35 AÑOS (G2) (n= 12)	36 a 40 AÑOS (G3) (n= 21)	MAYORES DE 40 AÑOS (G4) (n= 24)
Volumen (mL)	2.42 ± 0.53	2.83 ± 1.40	2.12 ± 0.67	2.12 ± 1.26
pH	8.15 ± 0.10	8.21 ± 0.18	8.15 ± 0.12	8.10 ± 0.35
Concentración (mill/mL)	32.25 ± 17.65	46.58 ± 16.97	34.19 ± 19.75	41.37 ± 18.54
Progresivos (%)	39.25 ± 4.11	41 ± 6.32	37.33 ± 11.25	34.83 ± 10.96
No Progresivos (%)	11.25 ± 0.95	13.41 ± 8.02	10.66 ± 2.81	11.50 ± 1.56
Inmóviles (%)	49.50 ± 4.65	45.58 ± 12.16	52.42 ± 11.10	53.66 ± 11.18
Vitalidad (%)	74 ± 4.54	75.83 ± 5.23	72.90 ± 10.57	69.70 ± 11.88
Normales (%)	2.50 ± 0.57	2.75 ± 0.75	2.14 ± 0.57	1.95 ± 0.80*
Anormales (%)	97.50 ± 0.57	97.25 ± 0.75	97.85 ± 0.57	98.04 ± 0.80*
Defectos en cabeza	90.75 ± 6.44	89.25 ± 2.63	91.19 ± 5.63	91.41 ± 5.53
Defectos en pieza media	86.50 ± 9.11	86.16 ± 6.23	88 ± 4.43	88.29 ± 6.71
Defectos en flagelo	8.25 ± 6.29	7.25 ± 4.90	8.95 ± 4.69	9.83 ± 0.93
Residuo citoplasmático	10.50 ± 5.91	12.83 ± 7.68	13.52 ± 6.10	14.70 ± 7.08
MAI	1.91 ± 0.16	2.13 ± 0.34	2.09 ± 0.52	2.52 ± 1.01
TZI	2.01 ± 0.21	2.77 ± 0.84	2.39 ± 0.97	3.27 ± 1.78
SDI	1.84 ± 0.19	1.84 ± 0.09	1.88 ± 0.08	1.90 ± 0.11

Se compararon los parámetros seminales de las muestras en fresco evaluados en los cuatro grupos. Índice de anomalías múltiples (MAI), índice de teratozoospermia (TZI) e índice de deformidad espermática (SDI). Media ± DEM. *p<0.05 **G2 vs G4**.

Así mismo, se evaluó el nivel de fragmentación del ADN espermático utilizando la prueba SCD de los cuatro grupos (**Tabla 4**), la obtención del porcentaje de fragmentación del ADN se obtuvo mediante la observación de 500 células por duplicado en cada muestra, clasificando a las células dependiendo del tamaño del

halo de dispersión de la cromatina como se aprecia en la Figura 11, tras la cuantificación de los espermatozoides se calculó el DFI, registrándose en los grupos índices elevados de fragmentación (> 30 %) en los grupos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al tratarse de porcentajes similares entre ellos.

Tabla 4. Índice de fragmentación del ADN espermático (DFI) en fresco

	MENORES DE 30 AÑOS (G1) (n= 4)	31 a 35 AÑOS (G2) (n= 12)	36 a 40 AÑOS (G3) (n= 21)	MAYORES DE 40 AÑOS (G4) (n= 24)
DFI (%)	39.60 ± 7.17	41.15 ± 6.06	38.97 ± 8.09	42.27 ± 6.24

Comparación del índice de fragmentación del ADN. Media ± DEM

Una vez recuperadas las muestras después del lavado seminal, se volvió a evaluar la concentración y la motilidad progresiva, en un volumen de 1 mL (Tabla 5). Los parámetros seminales post-lavado no mostraron diferencias significativas entre los cuatro grupos de estudio por edad, pese a tener una concentración y motilidad inferior a los límites de referencia establecidos por la OMS, estas resultaron con mejor motilidad espermática en comparación a la observada en fresco, siendo móviles progresivos rápidos.

En la **Tabla 5** también se incluye el DFI post-lavado en el que, de manera similar a los parámetros seminales, los valores entre los grupos no son estadísticamente significativos, aunque podemos ver que el DFI en estas muestras recuperadas sigue siendo > 30 %.



Tabla 5. Análisis seminal post-lavado				
PARÁMETROS SEMINALES	MENORES DE 30 AÑOS (G1) (n= 4)	31 a 35 AÑOS (G2) (n= 12)	36 a 40 AÑOS (G3) (n= 21)	MAYORES DE 40 AÑOS (G4) (n= 24)
Concentración (mill/mL)	7.75 ± 9.06	6.91 ± 7.70	6.17 ± 6.30	4.02 ± 5.21
Progresivos (%)	31 ± 8.64	28.66 ± 6.52	28.33 ± 17.36	25.54 ± 10.89
DFI (%)	32.32 ± 5.94	32.54 ± 4.93	31.19 ± 4.66	33.08 ± 3.79

Comparación de los parámetros seminales y fragmentación del ADN espermático post-lavado. Media ± DEM.

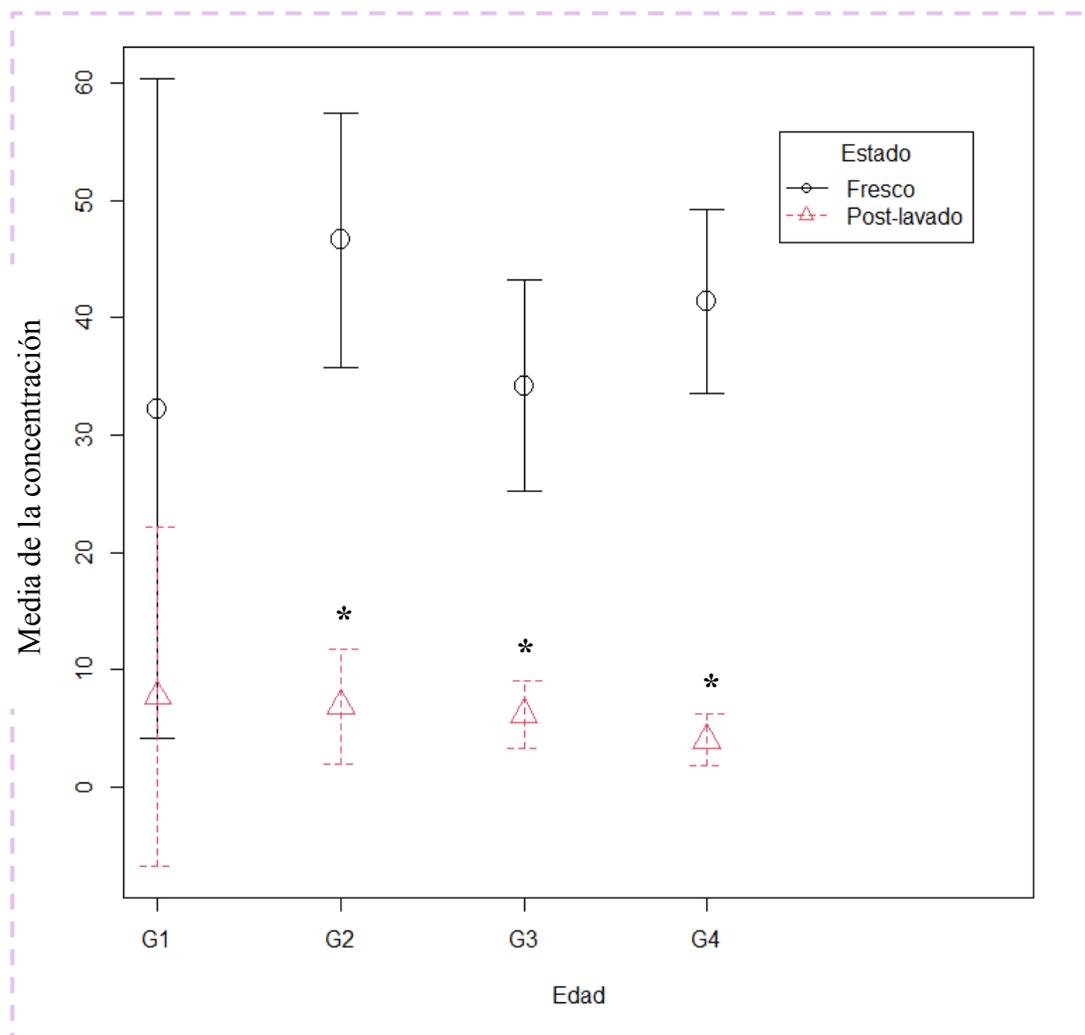


Figura 14. Diferencia en la concentración espermática por grupo de edades de las muestras seminales en fresco y post-lavado. Media ± intervalo de confianza. *p<0.05 vs fresco.

Representado en la **Figura 14**, la concentración espermática de los grupos 2, 3 y 4 presentó diferencia estadísticamente significativa en cada grupo analizado, obteniéndose una concentración menor posterior al lavado seminal y recuperación de la muestra en comparación con la concentración de la muestra en fresco, mientras que las concentraciones en el grupo 1 no se muestran estadísticamente significativas.

La evaluación de la motilidad progresiva en fresco y post-lavado seminal de los cuatro grupos de estudio mostró diferencias significativas en el grupo 2 y en el 4 (**Figura 15**), presentando un porcentaje de espermatozoides móviles progresivos menor en las muestras recuperadas de la técnica de lavado seminal a diferencia de la motilidad observada en fresco, en cambio, estadísticamente en los grupos 1 y 3 la motilidad progresiva en ambas muestras se mantuvo semejante. Cabe destacar que la motilidad obtenida posterior al lavado seminal se observó con mejoría con respecto a la rapidez y trayectoria de los espermatozoides, siendo en su gran mayoría móviles progresivos rápidos.

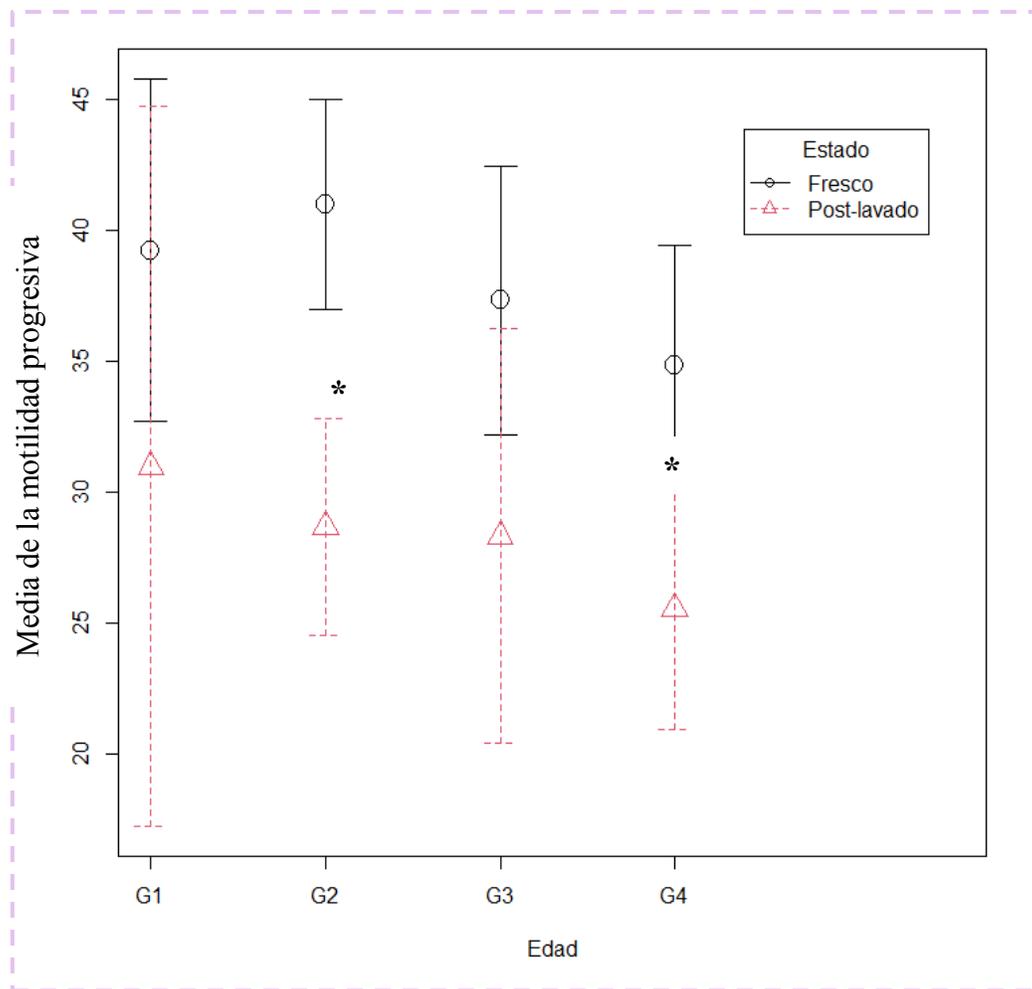


Figura 15. Comparación en la motilidad progresiva espermática de las muestras seminales en fresco y post-lavado. Media \pm intervalo de confianza. * $p < 0.00$ vs fresco.

Comparando los niveles de fragmentación del ADN espermático de las muestras seminales en fresco con las muestras post-lavado, podemos observar que la técnica de lavado seminal permitió recuperar espermatozoides con un índice de fragmentación del ADN significativamente menor en los grupos 2 (41.15 ± 6.06 fresco y 32.54 ± 4.93 post-lavado), 3 (38.97 ± 8.09 fresco y 31.19 ± 4.66 post-lavado) y 4 (42.27 ± 6.24 fresco y 33.08 ± 3.79 post-lavado) en comparación con el nivel de fragmentación presentado en los espermatozoides en fresco, diferencia expresada en la **Figura 16**. Los valores del DFI en fresco y post-lavado del grupo 1 no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

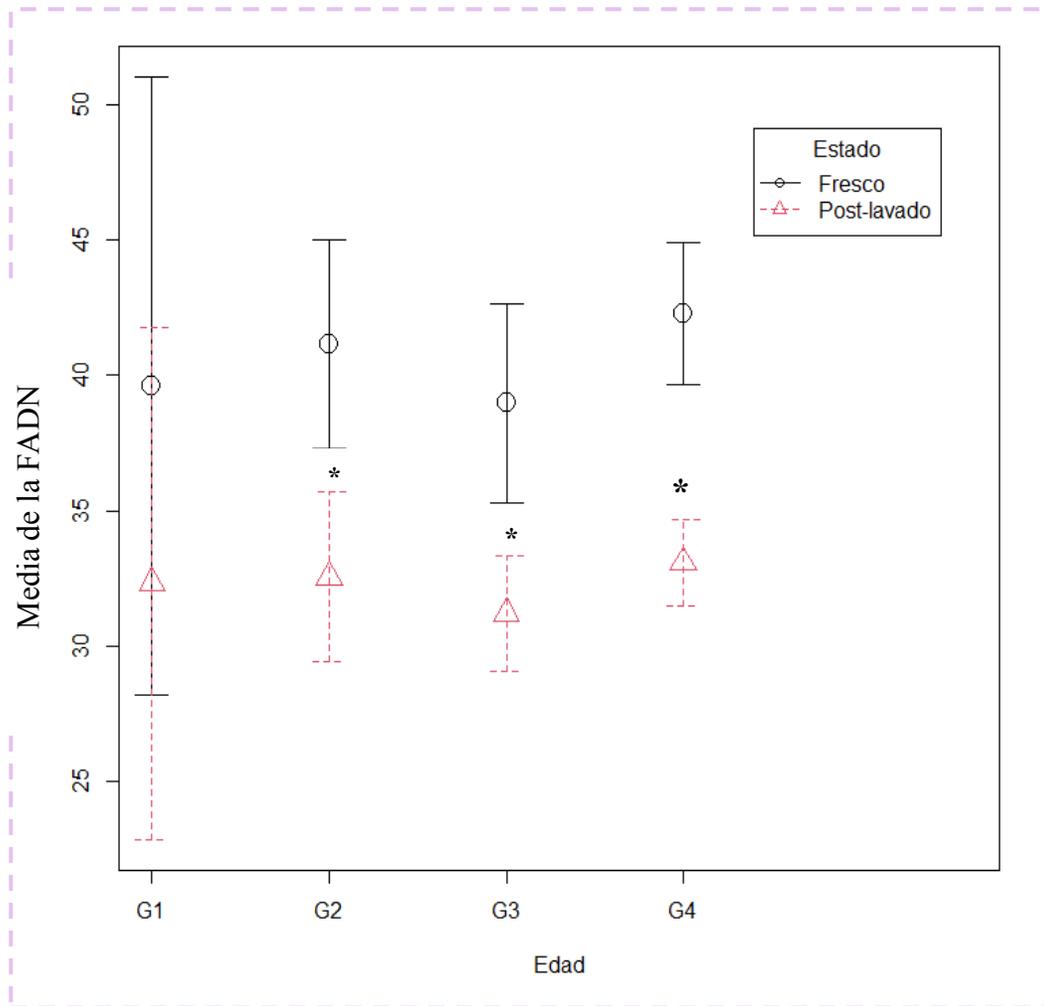


Figura 16. Diferencia en el índice de fragmentación del ADN espermático de las muestras seminales en fresco y post-lavado. * $p < 0.05$ vs fresco.

10.2 Clasificación por etiología

Las 61 muestras evaluadas de pacientes seropositivos a VIH pudieron agruparse dependiendo de la etiología que presentara cada muestra posterior al análisis seminal en fresco, esta clasificación se realizó de acuerdo con los límites de referencia establecidos en el manual de la OMS (Tabla 2) que, de no encontrarse dentro de los mismos la OMS ha designado términos médicos mencionados con anterioridad.

En la **Tabla 6** se pueden observar los parámetros seminales evaluados en fresco de los cuatro grupos incluyéndose el índice de fragmentación del ADN espermático,

así como las diferencias estadísticas encontradas entre cada uno. Se compararon los grupos con astenoteratozoospermia, teratozoospermia y otras etiologías con las muestras consideradas como normozoospermicas, mostrando diferencias significativas, siendo los grupos de astenoteratozoospermia y con otras etiologías en los que se aprecia una calidad seminal más afectada, teniendo parámetros seminales como la motilidad progresiva y la vitalidad por debajo de los límites de referencia.

Con respecto a la concentración espermática, resultó ser significativamente menor en el grupo de otras etiologías con respecto al grupo de normozoospermia y teratozoospermia. El porcentaje de espermatozoides progresivos fue significativamente menor en el grupo de astenoteratozoospermia comparado con el grupo de normozoospermia y teratozoospermia, también se mostró un porcentaje menor en otras etiologías con respecto al grupo de teratozoospermia, suceso que se presenta de manera similar en el porcentaje de espermatozoides inmóviles.

Tabla 6. Análisis seminal en fresco en grupos de etiología				
PARÁMETROS SEMINALES	NORMOZOOSPERMIA (n= 3)	ASTENOTERATOZOOSPERMIA (n= 8)	TERATOZOOSPERMIA (n= 44)	OTRAS ETIOLÓGICAS (n=6)
Volumen (ml)	1.83 ± 0.20	1.71 ± 0.45	2.46 ± 1.22	1.95 ± 0.65
pH	7.80 ± 0.70	8.17 ± 0.14	8.16 ± 0.21	8.16 ± 0.16
Concentración (mill/ml)	59.66 ± 24.50	31.75 ± 13.10	43.09 ± 16.66**	11.66 ± 3.14*
Progresivos (%)	38.66 ± 2.30	24.50 ± 5.26*	40.90 ± 7.12^a	26.16 ± 14.77**
No Progresivos (%)	12.66 ± 1.15	10.50 ± 1.51	11.84 ± 4.65	10.50 ± 1.51
Inmóviles (%)	48.66 ± 1.15	65 ± 6.45*	47.45 ± 8.63^a	63.33 ± 14.55**
Vitalidad (%)	74 ± 5.29	68.25 ± 5.97	75.34 ± 6.68**	54.50 ± 17.37*
Normales (%)	4 ± 0.00	1.62 ± 0.74*	2.22 ± 0.60*	2 ± 0.63*
Anormales (%)	96 ± 0.00	98.37 ± 0.74*	97.77 ± 0.60*	98 ± 0.63*
Defectos en cabeza	86 ± 4.00	89.37 ± 5.99	91.81 ± 4.29	88.33 ± 8.21
Defectos en pieza media	81 ± 12.76	86.87 ± 4.99	88.20 ± 5.28	88 ± 7.72
Defectos en flagelo	4.66 ± 2.08	7.62 ± 3.20	9.50 ± 4.60	8.50 ± 5.04
Residuo citoplasmático	4.66 ± 0.57	14.37 ± 8.01	14.04 ± 6.61	14.33 ± 5.31
MAI	1.91 ± 0.36	2.26 ± 0.61**	2.12 ± 0.32**	3.44 ± 1.83*
TZI	2.36 ± 1.00	2.83 ± 1.25**	2.56 ± 0.79**	4.65 ± 3.08**
SDI	1.74 ± 0.15	1.84 ± 0.08	1.89 ± 0.10	1.88 ± 0.11
DFI (%)	45.86 ± 6.46	41 ± 7.38	40.11 ± 5.94	43.25 ± 11.26

Se compararon los parámetros seminales de las muestras en fresco evaluados en los cuatro grupos. Media ± DEM. * p < 0.05 diferencia con normozoospermicos, ** p < 0.05 diferencia con otras etiologías, ^a p < 0.05 diferencia entre teratozoospermia y astenozoospermia

La vitalidad espermática fue diferente entre los cuatro grupos, siendo significativamente menor en el grupo de otras etiologías en comparación con los otros tres grupos. El porcentaje de espermatozoides normales también resultó estadísticamente menor en todos los grupos comparado con el de normozoospermia, contrario a lo que se observa en los espermatozoides anormales, en los que se obtuvo un mayor porcentaje en otras etiologías, teratozoospermia y astenoteratozoospermia en contraste con los normozoospermicos, **Tabla 6**.

El MAI, mostró diferencias significativas entre el grupo de otras etiologías con respecto a los otros tres grupos, presentando un índice mayor a ellos, que ocurre de forma similar en el índice de teratozoospermia. El DFI evaluado también en fresco, fue $> 30 \%$ en los cuatro grupos, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de los parámetros seminales evaluados post-lavado y cómo se puede apreciar en la **Tabla 7**, también se encontraron diferencias significativas en la concentración espermática, resultado estadísticamente menor en astenozoospermia, teratozoospermia y otras etiologías contrastado con la concentración espermática en normozoospermia. Tanto el porcentaje de motilidad progresiva como el índice de fragmentación del ADN espermático no presentó diferencias significativas.

Tabla 7. Análisis seminal post-lavado en grupos de etiología

PARÁMETROS SEMINALES	NORMOZOOSPERMIA (n= 3)	ASTENOZOOSPERMIA (n= 8)	TERATOZOOSPERMIA (n= 44)	OTRAS ETIOLOGÍAS (n= 6)
Concentración (mill/mL)	16.33 ± 10.96	2.75 ± 3.53*	5.91 ± 6.05*	1.53 ± 1.31*
Progresivos (%)	35.33 ± 7.02	20.50 ± 10.95	28 ± 8.60	29 ± 31.31
DFI (%)	35.33 ± 4.56	32.27 ± 5.37	32.09 ± 4.23	32.06 ± 5.22

Comparación de los parámetros seminales y fragmentación del ADN espermático post-lavado. Media ± DEM. *p < 0.05 vs normozoospermia.

10.3 Clasificación por nacionalidad

Similar a lo realizado en la evaluación de los parámetros seminales para los grupos por edad y por etiología, las 61 muestras se agruparon de acuerdo a la nacionalidad del paciente, siendo nacionales y extranjeros los grupos en esta categoría, realizando la comparación de los parámetros seminales en fresco y posterior al lavado seminal, incluyendo la fragmentación del ADN espermático entre ambos.

Tabla 8. Análisis seminal en fresco en grupos de nacionalidad.

PARÁMETROS SEMINALES	NACIONALES (n= 12)	EXTRANJEROS (n= 49)	p
Volumen (mL)	3.02 ± 2.03	2.10 ± 0.63	NS
pH	8.05 ± 0.36	8.17 ± 0.21	NS
Concentración (mill/mL)	51.33 ± 20.24	36.38 ± 17.46*	0.03
Progresivos (%)	43.41 ± 8.40	35.67 ± 9.95*	0.01
No Progresivos (%)	12.25 ± 3.67	11.40 ± 4.15	NS
Inmóviles (%)	44.33 ± 6.51	53.10 ± 11.54*	0.001
Vitalidad (%)	78.41 ± 7.45	70.79 ± 10.21*	0.007

Normales (%)	2.58 ± 0.79	2.12 ± 0.72	NS
Anormales (%)	97.41 ± 0.79	97.87 ± 0.72	NS
Defectos en cabeza	90.75 ± 4.63	90.89 ± 5.29	NS
Defectos en pieza media	84.58 ± 7.27	88.40 ± 5.31	NS
Defectos en flagelo	7.91 ± 3.55	9.16 ± 4.67	NS
Residuo citoplasmático	13.83 ± 7.76	13.61 ± 6.55	NS
MAI	1.97 ± 0.29	2.33 ± 0.81*	0.01
TZI	2.28 ± 0.68	2.91 ± 1.45*	0.03
SDI	1.84 ± 0.19	1.84 ± 0.09	NS
DFI (%)	39.39 ± 8.07	41.17 ± 6.46	NS

Comparación de los parámetros seminales y fragmentación del ADN espermático en fresco. Media ± DEM.

La comparación de los parámetros seminales entre nacionales y extranjeros revela diferencias estadísticamente significativas en la concentración, motilidad progresiva y el porcentaje de vitalidad, que, como se puede observar en la **Tabla 8**, en el grupo de extranjeros dichos parámetros se encuentran reducidos en contraste con los nacionales, contrario a lo observado con el porcentaje de espermatozoides inmóviles, el índice de anormalidades múltiples y el índice de teratozoospermia, en los que se tiene un mayor porcentaje en los extranjeros comparado con los nacionales, por lo tanto en los pacientes extranjeros seropositivos a VIH, la calidad seminal es reducida.

Diferente a lo observado en los parámetros seminales en fresco, post-lavado la concentración, el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y el índice de fragmentación del ADN espermático no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (**Tabla 9**).

Tabla 9. Análisis seminal post-lavado en grupos de nacionalidad		
PARÁMETROS SEMINALES	NACIONALES	EXTRANJEROS
Concentración (mill/mL)	9.33 ± 9.01	4.65 ± 5.24
Progresivos (%)	28.25 ± 6.96	27.28 ± 13.75
DFI (%)	31.47 ± 5.99	32.47 ± 4.02

Comparación de los parámetros seminales y fragmentación del ADN espermático post-lavado. Media ± DEM.

Tomando en cuenta el índice de fragmentación del ADN espermático de las muestras en fresco y post-lavado de las tres clasificaciones analizadas en este trabajo (edad, etiología y nacionalidad), a pesar de que las muestras post-lavado mostraron una reducción en el DFI, podemos observar valores que siguen siendo > 30 % por lo que el material genético de los pacientes seropositivos a VIH sí se ve muy comprometido con la infección y el tratamiento antirretroviral.

10.4 Correlación de los parámetros seminales en fresco y post-lavado con la fragmentación del ADN

Se analizó si existía correlación entre los parámetros seminales en fresco, como la concentración, volumen, motilidad y la morfología espermática, particularmente con los espermatozoides anormales junto con el porcentaje de sus defectos en cabeza, pieza media y flagelo, el índice de teratozoospermia, anomalías múltiples y de deformidad, y el índice de fragmentación espermática (DFI), determinándose en este caso que no se observa una correlación entre estos parámetros, tal como se aprecia en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Índice de correlación en fresco		
PARÁMETROS SEMINALES EN FRESCO	DFI (%)	
	<i>r</i>	<i>p</i>
Volumen	-0.21	0.09
Concentración	-0.05	0.69
Progresivos	-0.17	0.18
No Progresivos	0.03	0.79
Inmóviles	0.14	0.27
Anormales	-0.04	0.72
Defectos en cabeza	0.10	0.43
Defectos en pieza media	0.04	0.73
Defectos en flagelo	0.19	0.13
MAI	0.14	0.26
TZI	0.14	0.26
SDI	0.17	0.18

Índice de correlación (*r*) entre el porcentaje DFI y los parámetros seminales de muestras en fresco seropositivas a VIH. (Correlación de Pearson).

Con los datos obtenidos de los parámetros seminales post-lavado se analizó si existía correlación entre ellos y el índice de fragmentación del ADN espermático, determinando que de manera similar a los parámetros seminales y el DFI en fresco, no existía una correlación entre ellos (Tabla 11).

Tabla 11. Índice de correlación post-lavado		
PARÁMETROS SEMINALES POST-LAVADO	DFI (%)	
	<i>r</i>	<i>p</i>
Concentración (mill/mL)	-0.008	0.94
Progresivos (%)	-0.09	0.44

Índice de correlación (*r*) entre el porcentaje de DFI espermático y parámetros seminales de concentración y motilidad progresiva (correlación de Pearson).



11. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la calidad seminal de 61 muestras en fresco y post-lavado de pacientes seropositivos a VIH mediante un análisis seminal siguiendo los criterios establecidos por el manual de la OMS (WHO, 2020), así como el nivel de daño en el ADN espermático mediante la prueba SCD, confirmándose en primera instancia una calidad seminal afectada en los pacientes seropositivos a VIH de los grupos conformados, así como elevados niveles de fragmentación del ADN espermático, resultados que concuerdan con los observados por Crittenden y colaboradores en 1992 y Nicopoullos y colaboradores en 2011.

El seminograma es un estudio esencial y rutinario para predecir el potencial de fertilidad en los varones del mismo modo que proporciona información sobre el éxito de la fertilización *in vitro* mediante técnicas de reproducción asistida. Este se divide en análisis macroscópicos, integrándose por la evaluación de la licuefacción, la viscosidad, el pH, volumen y color de la muestra, dichos parámetros también reflejan información sobre la función de las glándulas secretoras; por ejemplo, la viscosidad que, previo a la licuefacción de la muestra es normal que se encuentre elevada ya que facilita el ingreso de los espermatozoides al moco cervical, mantiene la velocidad espermática, así como previene la peroxidación lipídica. No obstante, Baskaran y colaboradores (2020) resaltan que, la hiperviscosidad en la muestra posterior al tiempo en el que debe ocurrir la licuefacción se asocia a una infección e inflamación de las glándulas accesorias o del sistema inmune, viéndose afectada la motilidad espermática y calidad seminal.

Lo anterior podría explicar que la mayoría de las muestras evaluadas en este estudio se encontraban con una viscosidad aumentada por la afectación del virus del VIH en el sistema inmune. Con respecto a los demás parámetros seminales macroscópicos analizados, se encontraban dentro de los estándares establecidos por la OMS.

Dentro del seminograma también se incluye el análisis microscópico, en el que se evalúan la concentración, vitalidad, motilidad y morfología espermática. Parámetros

que pueden ayudar a identificar anomalías en el estado del acrosoma, integridad de la membrana celular e incluso diversos estudios mencionan que de igual forma mediante ellos es posible darse una idea de la integridad de la cromatina nuclear (Mangiarini *et al.*, 2013; Sadeghi *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2020) al verse alterada la motilidad y la morfología espermática, no obstante, para corroborar la presencia de daño en la cromatina espermática es recomendable el empleo de cualquiera de las técnicas disponibles para evaluar el daño o fragmentación en el ADN espermático en complemento con el seminograma.

En el presente estudio, además, se realizó una clasificación de las muestras dependiendo la edad del paciente, la etiología y la nacionalidad debido a que cada uno de esos también se ve implicado en las alteraciones que se pueden encontrar en la calidad seminal y en caso de este estudio pueden encontrarse incrementadas debido a la presencia del virus de VIH, por ejemplo, múltiples estudios han determinado que la edad paterna se correlaciona de forma negativa con parámetros seminales como el volumen seminal, la motilidad espermática progresiva y la morfología espermática, evento observado en este trabajo, encontrando una concentración menor de espermatozoides normales en las muestras de pacientes mayores de 40 años (1.95 ± 0.80) en comparación con pacientes de menor edad, y en consecuencia, podemos observar un mayor porcentaje de espermatozoides anormales en dicho grupo (98.04 ± 0.80) (Lai *et al.*, 2018; Ulubay *et al.*, 2022).

Con relación al resto de los parámetros seminales no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de edades a diferencia del estudio realizado por Ulubay y colaboradores (2022), quienes confirmaron diferencias entre menores de 30 años y mayores de 40 años con problemas en su fertilidad, viéndose reducidos parámetros como la concentración y mencionado anteriormente, la motilidad y el porcentaje de espermatozoides anormales. Estos autores atribuyen este descenso en los parámetros seminales en primera instancia a una disminución de los niveles de andrógenos relacionada con la edad y una disminución de las funciones del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias que de igual manera ocurren conforme avanza la edad, así como alza en los niveles de ERO (Ulubay *et al.*, 2022).

Al analizar las muestras seminales y detectar alguna anomalía en los parámetros se le asigna un nombre a la etiología de acuerdo con lo sugerido por la OMS en sus manuales para la examinación y procesamiento de muestras seminales (2020), el conocer esta etiología permite la elaboración de estrategias para tratarla, además brinda una idea del resultado que se obtendrá con un procedimiento de reproducción asistida. En adición, este tipo de etiologías en las muestras seminales se han correlacionado con elevados índices de fragmentación del ADN espermático (Tang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023). En los resultados obtenidos (Tabla 6), los índices de fragmentación se encuentran por arriba del 30 % en los grupos con astenoteratozoospermia, teratozoospermia y otras etiologías.

En este estudio fue relevante clasificar las muestras por etiología en razón de que al ser pacientes seropositivos a VIH y encontrarse bajo tratamiento antirretroviral son más propensos a presentar alguna de ellas en su muestra o incluso varias en la misma muestra (Ahmad *et al.*, 2011) como el caso de los pacientes con astenoteratozoospermia (motilidad < 30 % y morfología < 4 %), en esta clasificación es evidente la diferencia significativa de la mayoría de los parámetros seminales comparándolos con los de las muestras de pacientes normozoospermicos, principalmente en la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides normales y el índice de teratozoospermia, parámetros que al tener alteraciones pueden influir de forma negativa en el éxito reproductivo (Tang *et al.*, 2020).

Con relación a la clasificación de los grupos por nacionalidad es imperativo realizar más estudios, por calidad de vida y situaciones ambientales en las que se encuentran los diversos países debido a que estos factores influyen en la calidad de sus muestras seminales. En el presente trabajo se encontró la calidad seminal reducida en el grupo de extranjeros contrastado con el de los nacionales principalmente en la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, el porcentaje de espermatozoides inmóviles, siendo mayor en el grupo de extranjeros en comparación con los nacionales y el índice de teratozoospermia. Datos que podrían explicarse por los contaminantes que hay en el ambiente en países más industrializados ya que se ha postulado que las toxinas

ambientales contribuyen en una disminución de la calidad espermática, en particular menor concentración espermática y volumen seminal, así como una morfología anormal más elevada (Mann *et al.*, 2020).

En general, en las tres clasificaciones evaluadas en este trabajo (edad, etiología y nacionalidad) y tomando en cuenta los resultados obtenidos mediante la evaluación de la calidad seminal de las muestras de pacientes seropositivos a VIH, se puede observar disminución en esta teniendo como referencia los límites de decisión establecidos por el manual de la OMS para pacientes normozoospermicos.

De acuerdo con algunos estudios, el VIH al encontrarse en células presentes en el líquido seminal y al tener la capacidad de adherirse a los espermatozoides por medio del acrosoma, pieza media o en parte del flagelo, podría generar afectación en algunos parámetros seminales. Así también, está claro el efecto que puede tener el tratamiento antirretroviral sobre el gameto masculino, principalmente en la motilidad y concentración espermática, el volumen seminal e incluso hay reportes que encontraron cambios en el pH de las muestras como en el estudio realizado por Nicopoullou y colaboradores en 2004, no obstante, en nuestros datos no se encontró alteración en este factor.

Comparado con otros análisis, en los resultados del estudio no se encontró una concentración espermática por debajo de los límites de referencia propuestos por la OMS (<16 millones/mL) con excepción del grupo de otras etiologías (11.66 ± 3.14), sin embargo, tomando en cuenta los resultados obtenidos en el trabajo de Nicopoullou y colaboradores en 2004, las concentraciones espermáticas son menores comparándose con las muestras de pacientes fértiles. La motilidad espermática en las muestras evaluadas en el presente estudio fue otro parámetro que se detectó reducido, del mismo modo que Kato y colaboradores (2006) y Garolla y colaboradores (2013) quienes reportaron alteraciones en la motilidad espermática principalmente una motilidad progresiva lenta y motilidad no progresiva en las muestras de pacientes seropositivos a VIH comparándolos con su grupo control. Este comportamiento en la motilidad del espermatozoide es desfavorable ya que

una buena motilidad es de vital importancia para que se dé una fecundación exitosa, y el mecanismo por el cual esta puede disminuir es mediante el daño mitocondrial que se ha visto que es provocado principalmente por los medicamentos antirretrovirales (Ahmad *et al.*, 2011).

La morfología espermática también es un parámetro importante a analizar, esto debe hacerse de forma minuciosa para detectar las alteraciones en cualquier zona del espermatozoide (cabeza, pieza intermedia y flagelo), este parámetro nos puede dar una idea sobre qué está pasando en la espermatogénesis y se cree que puede tener impacto durante la fecundación. Estudios han reportado una morfología alterada en pacientes infectados con VIH en un rango de entre el 58-80 % de las muestras analizadas, encontrando alteraciones principalmente en la cabeza y flagelo (Muciaccia *et al.*, 2007). De manera similar, nuestros resultados demuestran que en estos pacientes hay elevados porcentajes de espermatozoides anormales con alteración en la cabeza y por lo tanto un elevado índice de teratozoospermia. En los espermatozoides anormales de estas muestras seminales generalmente se detecta ADN VIH-1 positivo y con ello un porcentaje mayor de ADN fragmentado.

La afectación en los parámetros seminales de los pacientes infectados con VIH se ha relacionado con varios factores, pero aún no está bien claro el mecanismo por el que el VIH es capaz de alterar estos parámetros. Entre los factores que se cree que afectan la calidad seminal se encuentra:

- El efecto de la enfermedad más avanzada y la infección con otros microorganismos sobre la espermatogénesis.
- El aumento en las ERO generadas por el virus y por los medicamentos antirretrovirales, así como cambios en el metabolismo del espermatozoide por la toxicidad mitocondrial generada por el tratamiento (Savasi *et al.*, 2018).
- Otro factor argumentado por Nicopoullou y colaboradores (2004) que no es efecto directo del virus del VIH, sino una de las consecuencias de padecerlo, es el tiempo de abstinencia sexual, ya que se sabe que lapsos prolongados

sin actividad sexual también afectan en la calidad seminal, y los hombres infectados con VIH suelen tener periodos de abstinencia más prolongados por efecto de la enfermedad sobre el libido, también para prevenir la seroconversión de su pareja y porque existen diferencias culturales con relación a la masturbación.

- La baja motilidad se ha relacionado con niveles bajos en la testosterona detectados en los pacientes infectados con VIH (Nicopoullou *et al.*, 2004). De hecho, se ha demostrado que es común que hombres con VIH padezcan de hipogonadismo y trastornos endocrinos (Sauer, 2005).

Lo anterior puede explicarse mediante lo postulado por Frainais y colaboradores (2010), quienes agregan que los linfocitos infectados pueden interactuar con las células de Leydig y disminuir los niveles de testosterona por inhibición de la esteroidogénesis o disfunción del eje pituitario.

La variación entre los resultados del análisis de los parámetros seminales en estos pacientes infectados con VIH encontrada entre diversos autores que encuentran afectada o no la calidad seminal puede deberse a la cantidad de muestras evaluadas, a variaciones en las metodologías e incluso diferencias en el grado de infección por VIH en los grupos de estudio

Con respecto a los índices de fragmentación del ADN espermático elevados registrados en este estudio, teniendo valores mayores del 30 % en todos los grupos analizados de las muestras seropositivas a VIH, estos resultados también concuerdan con los encontrados por Bujan y colaboradores (2007); Muciaccia y colaboradores (2007) y Frainais y colaboradores (2010), donde se registraron tasas de fragmentación del ADN espermático en muestras de pacientes seropositivos a VIH en comparación con un grupo control. En adición Garolla y colaboradores (2013) establecen que los espermatozoides infectados pueden ser portadores de aneuploidías y del ADN fragmentado.

Los niveles elevados de fragmentación del ADN generan muchos problemas al momento de la fecundación y posterior desarrollo embrionario implicando incluso transmisión de defectos genéticos a la descendencia. En este aspecto, Evenson y colaboradores (2002) establecieron una escala y determinaron cuatro categorías para el potencial fertilizante del espermatozoide según el índice de fragmentación del ADN en las muestras, dichas categorías son: i) excelente si el DFI <15 %; ii) alto si el DFI 15-24 %; iii) bajo si el DFI 25-30 %; iv) muy bajo si el DFI >30 %. Por lo tanto, en nuestro estudio determinamos que las muestras seminales evaluadas tenían un potencial fertilizante muy bajo al ser todos los DFI > 30 % tanto en fresco como después del lavado seminal.

Existen diversos factores a los que se puede atribuir los elevados valores de fragmentación del ADN espermático en estos pacientes. En primer lugar, se reconoce que en muestras seminales de pacientes infectados con enfermedades virales crónicas como el VIH puede haber un efecto directo del virus en la estructura nuclear de la muestra, así como un efecto indirecto que afecta la integridad del ADN espermático por medio del estrés oxidante producido por reacciones inflamatorias durante el transcurso de la infección. En relación con el daño en el ADN provocado por el estrés oxidante, estudios han detectado que los virus del VIH-1 inducen la producción de radicales libres y tienen defensas reducidas contra el estrés oxidante (Frainais *et al.*, 2010). La sobreproducción de ERO provoca la peroxidación lipídica que es responsable del daño en la cromatina y roturas de la cadena de ADN del espermatozoide (Savasi *et al.*, 2018).

Otro de los factores reportados que afectan la calidad del ADN espermático es el consumo del tratamiento antirretroviral recetado para pacientes infectados con VIH, en particular con los inhibidores de los nucleósidos de la transcriptasa inversa que Frainais y colaboradores (2010) mencionan que aumentan las alteraciones del ADN espermático nuclear. La elevada tasa de fragmentación del ADN encontrada tras el uso de la terapia antirretroviral puede explicarse por la hipótesis de que tienen la capacidad de modificar el núcleo del espermatozoide y aumentar la apoptosis nuclear.

Está claro que el tratamiento antirretroviral ha mejorado de forma significativa el pronóstico de los pacientes infectados por VIH-1, a pesar de ello, se ha reportado que tiene efectos perjudiciales como la toxicidad mitocondrial de células somáticas como las neuronas. Además, como se mencionó anteriormente, también se ha informado de un efecto sobre los parámetros del gameto masculino principalmente sobre la concentración y la motilidad espermática, misma que también se ve afectada por disminución de la actividad mitocondrial (Ahmad *et al.*, 2011). Relacionado con lo anterior, Pavili y colaboradores en 2010 encontraron una disminución en el número de copias del ADN mitocondrial (ADNmt) en el espermatozoide relacionado con el uso de HAART, afectación también reportada por Garolla y colaboradores en 2013.

Pese a determinar una mala calidad seminal y niveles elevados en la fragmentación del ADN espermático entre los grupos analizados, en nuestro estudio no se encontró alguna correlación entre alguno de los parámetros afectados y el daño que tenía el ADN, que en comparación con los resultados obtenidos por diversos autores como Gu y colaboradores (2018) y Liu y colaboradores (2023), quienes determinaron que el índice de fragmentación del ADN espermático (DFI) estaba correlacionado con la edad del paciente, la concentración espermática, tasa de motilidad de los espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides anormales. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo en cambio, concuerdan con los obtenidos por Tang y colaboradores (2020) ya que ellos no encontraron una relación entre la morfología espermática y el DFI.

Así mismo, se observó la capacidad de la técnica de lavado seminal para recuperar muestras con una mejor calidad en relación con la motilidad progresiva y el DFI, comparada con su estado en fresco, otra de las ventajas de esta técnica es la prevención de la seroconversión del cónyuge y del feto, reportado también por Bujan y colaboradores en 2007, donde también se reportó que en las 967 mujeres tratadas con lavado seminal para procedimientos de reproducción asistida no ocurrió ninguna seroconversión usando este método, pese a ello aún existe un 10 % de probabilidad de que posterior al lavado la muestra resulte positiva y resulte en una

seroconversión como informan Sauer y Choi en 2006, en donde se reportó la seroconversión de una paciente tras el procedimiento de reproducción asistida con lavado seminal de VIH, cabe resaltar que el paciente infectado no se encontraba bajo terapia antirretroviral (Frainais *et al.*, 2010; Nicopoullos *et al.*, 2010).

Esta técnica de reproducción asistida mediante la centrifugación en gradientes de densidad junto con la técnica de “swim-up” separa de forma eficaz la fracción móviles de los espermatozoides del plasma seminal y de células no móviles en especial de linfocitos CD4 positivos que son objetivos principales de la infección por VIH (Sauer, 2005). También Muciaccia y colaboradores (2007) mencionan que en conjunto esas dos técnicas permiten la recuperación únicamente de espermatozoides móviles, generalmente con una morfología normal, membranas intactas y empaquetamiento de ADN normal.

La eliminación de estos viriones encontrados en el plasma seminal también se ha relacionado e informado que varía dependiendo de la carga viral seminal, por esta razón no se debe realizar el procedimiento de lavado seminal si la carga viral del VIH-1 es de 10 000 copias de ARN/mL y que sea indetectable en sangre (Muciaccia *et al.*, 2007).

Actualmente el lavado seminal de estas muestras seguidas por un procedimiento *in vitro*, recomendando principalmente el uso de ICSI, sigue siendo el método más efectivo para las parejas serodiscordantes con deseo de tener hijos y reducir el riesgo de transmisión del VIH a los recién nacidos (Carvalho *et al.*, 2020). Sin embargo, es importante mencionar a los pacientes que estos procedimientos no están exentos de riesgos ya que sigue existiendo la posibilidad de transmitir la infección.



12. CONCLUSIONES

El virus del VIH y el uso de antirretrovirales como tratamiento generan reducción en la calidad seminal obteniendo muestras con diferentes etiologías como astenoteratozoospermia y teratozoospermia, e incremento en la fragmentación del ADN espermático, principalmente en pacientes mayores de 40 años.

El lavado seminal para muestras de pacientes seropositivos a VIH, además de reducir la carga viral de las muestras, permite la recuperación de espermatozoides con mejor calidad en cuanto a morfología y motilidad progresiva, así como menor índice de la fragmentación del ADN espermática.

En el presente estudio no se encontró una correlación entre la calidad seminal en fresco de pacientes seropositivos a VIH con la fragmentación del ADN espermático, sin embargo, en estos resultados se muestran niveles elevados en el índice de fragmentación espermática en todas las muestras evaluadas, por lo que debe ser considerado como necesaria la evaluación de la fragmentación del ADN espermático de forma rutinaria en este tipo de muestras.



13. REFERENCIAS

- ♥ Agarwal, A., & Saleh, R. (2002). Role of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. *The Urologic clinics of North America*, 29, 817-827.
- ♥ Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). Measurement of DNA fragmentation in spermatozoa by TUNEL Assay using bench top flow cytometer. en A. Agarwal et al. (eds.), *Andrological Evaluation of Male Infertility*, (pp.181-203). Springer
- ♥ Ahmad, G., Moinard, N., Jouanolou, V., Daudin, M., Gandia, P., Bujan, L. (2011). *In vitro* assessment of the adverse effects of antiretroviral drugs on the human male gamete. *Toxicology in Vitro*, 25, 485-491.
- ♥ Aitken, R., Drevet, J., Moazamian, A., & Gharagozloo, P. (2022). Male Infertility and Oxidative Stress: A focus on the underlying mechanisms. *Antioxidants*, 11(306), 1-21.
- ♥ Albert, O., Reintsch, W., & Chan, P. (2016). HT-COMET: a novel automated approach for high throughput assessment of human sperm chromatin quality. *Human Reproduction*, 31, 46-938.
- ♥ Arce, V., Catalina, P., & Mallo, F. (2006). *Endocrinología*. Universidad de Santiago de Compostela. https://books.google.com.mx/books?id=wXVb4jwwU-oC&dq=eje+hipotalamo+hipofisis+testiculos&source=gb_s_navlinks_s
- ♥ Ávila, P., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.
- ♥ Berrios, O., & Sánchez, R. (2011). Congelación ultra rápida de espermatozoides humanos: efecto sobre la función espermática y producción de especies reactivas de oxígeno. *International Journal of Morphology*, 29(3), 899-906
- ♥ Bharath, R. (2017). Physiology and endocrinology of spermatogenesis. en K. Gunasekaran., & N. Pandiyan (eds.), *Male infertility*, (pp.17-26). Springer.
- ♥ Broseta, E., Budía, A., Burgués, J., & Luján, S. (2021). *Urología práctica*. Elsevier.

https://books.google.com.mx/books?id=Bz0HEAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- ♥ Bujan, L., Hollander, L., Coudert, M., Gilling-Smith, C., Vucetich, A., Guiber, J., Vernazza, P., Ohl, J., Weigel, M., Englert, Y., & Semprini, A. (2007). Safety and efficacy of sperm washing in HIV-1-serodiscordant couples where the male is infected: results from the European CREAThE network. *AIDS*, 21(14), 1909-1914.
- ♥ Burlinson, B. (2012). The *in vitro* and *in vivo* Comet assays. *Methods in Molecular Biology*, 817, 143-163.
- ♥ Cankut, S., Dinc, T., Cincik, M., Ozturk, G., & Selam, B. (2019). Evaluation of sperm DNA fragmentation via halosperm technique and TUNEL assay before and after cryopreservation. *Reproductive Sciences*, 26(12), 1575-1581.
- ♥ Cardona W., Berdugo, J., & Cadavid, A. (2008). Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urológicas Españolas*, 32(4), 443-445.
- ♥ Carlson, B. (2009). *Embriología humana y biología del desarrollo*. Elsevier.
- ♥ Carrell, D., & Aston, K038-0. (2013). *Spermatogenesis: Methods and Protocols*. Humana Press.
- ♥ Carvalho, W., Catafesta, E., Ferreira, I., Takata, S., Estevam, D., & Barbosa, C. (2020). Prevention of HIV transmission with sperm washing within fertile serodiscordant couples undergoing non-stimulated intrauterine insemination. *AIDS Care*, 33(4), 478-485.
- ♥ Christensen, D., Ganser-Pornillos, B., Johnson, J., Pornillos, O., Sundquist, W. (2020). Reconstitution and visualization of HIV-1 capsid-dependent replication and integration in vitro. *Science*, 370(6513), 1-24.
- ♥ Cohen, B., & Taylor, J. (2009). *El cuerpo humano. Salud y enfermedad*.
- ♥ Corona, G., Minhas, S., Giwercman, A., Bettocchi, C., Dinkelman, M., Dohle, G., Fusco, F., Kadioglou, A., Kliesh, S., Kopa, Z., Krausz, C. *et al.* (2019). Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 25(6), 733-757.

- ♥ Cortés, E., Dávila, M., López, C., Fernández, J., & Gosálvez, J. (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*, 31(2), 120-131.
- ♥ Crittenden, J., Handelsman, D., & Stewart, G. (1992). Semen analysis in human immunodeficiency virus infection. *Fertility Sterility*, 57, 1294- 1299.
- ♥ Donnelly, E., McClure, N., & Lewis S. (2001). Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertility and Sterility*, 76(5), 892- 900.
- ♥ Dwyer, A., & Quinton, R. (2019). Anatomy and physiology of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. En S. Llahana, C. Folli, C. Yedinak, A. Grossman (eds.), *Advanced practice in endocrinology nursing*, (pp.839- 852). Springer
- ♥ Egeber, D., Rehfeld, A., Kirstine, A., Alexandrova, K., Kjaerulff, S., Ronn, M., Vikkelso, J., Glensbjerg, MJuul, A. et al. (2018). Viable acrosome-intact human spermatozoa in the ejaculate as a marker of semen quality and fertility status. *Human Reproduction*, 33(3), 361-371.
- ♥ Espejo, M., & Salvador, Z. (21 de octubre de 2019). *¿Cómo es el espermatozoide?- Formación, partes y función*. Reproducción Asistida ORG. <https://www.reproduccionasistida.org/espermatozoide/#bibliografia>
- ♥ Espinoza, O., Cortés, S., & Lewis, S. (2010). Análisis de las variables del espermograma en jóvenes sanos de Arica-Chile. *Revista Médica de Chile*, 138, 1510-1516.
- ♥ Esteves, S., Zini, A., Coward, R., Evenson, D., Gosálvez, J., Lewis, S., Sharma, R., & Humaifan, P. (2020). Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, 53(2), 1-40.
- ♥ Evenson, D., Larson, K., & Jost, L. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*, 23, 25-43
- ♥ Evenson, D., & Wixon, R. (2006). Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Biomedicine Online*, 12(4), 466-472.

- ♥ Evenson, D. (2011). Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA): 30 years of experience with the SCSA. en A. Zini & A. Agarwal (eds.), *Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction*, (pp.125-149). Springer.
- ♥ Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoj, B., & Butto, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto superiore di Sanità*, 46(1), 5-14.
- ♥ Farkouh, A., Salvio, G., Kuroda, S., Saleh, R., Vogiatzi, P., & Agarwal, A. (2022). Sperm DNA integrity and male infertility: a narrative review and guide for the reproductive physicians. *Translational Andrology and Urology*, 11(7), 1023-1044.
- ♥ Ferguson, M., Rojo, D., von Lindern, J., & O'Brien, W. (2002). HIV-1 replication cycle. *Clinics in Laboratory Medicine*, 22(3), 611-635.
- ♥ Fernández, J., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., LaFromboise, M., & De Jonge, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*, 84(4), 833-842.
- ♥ Fernández, A., del Carmen, M., Clavero, A., Ruiz de Aain, R., Zamora, S., Roldan, M., Rabelo, B., Ramírez, J., Yoldi, A., & Castilla, J. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *ASEBIR*, 14, 17-25.
- ♥ Flores, I. (2018). Espermatobioscopia. Organización Mundial de la Salud 2010. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 23, 99-103.
- ♥ Frainais, C., Vialard, F., Rougier, N., Aegerther, P., Damond, F., Ayel, J., Yazbeck, C., Hazout, A., Selva, J. (2010). Impact of freezing/thawing technique on sperm DNA integrity in HIV-1 patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27, 415-421.
- ♥ Francis, S., Yelumalai, S., Jones C., & Coward, K. (2014). Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Human Fertility*, 17(2), 80-89.
- ♥ Freed, E. (2002). HIV-1 Replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 26(6), 13-33.

- ♥ García, M., Robledo, F., Collazos, A., Álvarez, E., Carrandi, B., Toña, F., Viciola, M., Zulaica, D., Méndez, N. (2001). Agentes biológicos. *Ministerio de sanidad y consumo*, 18, 1-191.
- ♥ Garolla, A., Pizzol, D., Bertoldo, A., Menegazzo, M., Barzon, L., & Foresta, C. (2013). Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *Journal of Reproductive Immunology*, 100, 20-29.
- ♥ Golberg, E., Lishko, P., Papadopoulos, V., & Zirkin, B. (2022). Editorial: Endocrine and paracrine regulation of spermatogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1-4.
- ♥ Griswold, M. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1), 1-17.
- ♥ Gu, X., Li, H., & Xiong, C. (2018). Correlation of DNA fragmentation index with age and sperm parameters in infertile men. *National Journal of Andrology*, 24, 608-612.
- ♥ Gunes, S., Al-Sadaan, M., & Agarwal, A. (2015). Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 31, 309-319.
- ♥ Hamilton, T., & Assumpção, M. (2019). Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote (Cambridge)*, 28(1), 1-8.
- ♥ Holstein, A., Schulze, W., & Davido, M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1 (107).
- ♥ Ivell, R. (2007). Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5, 15.
- ♥ Kalthur, S., & Kalthur, G. (2017). Anatomy and development of the male reproductive system. en K. Gunasekaran., & N. Pandiyan (eds.), *Male infertility*, (pp.1-15). Springer.
- ♥ Kannan, P. (2017). Ultrastructure of Human Spermatozoa. en K. Gunasekaran., & N. Pandiyan (eds.), *Male infertility*, (pp.27-39). Springer.
- ♥ Kato, S., Hanabusa, H., Kaneko, S., Takakuwa, K., Suzuki, M., Kuji, N., Jinno, M., Tanaka, R., Kojima, K., Iwashita, M., Yoshimura, Y., & Tanaka, K. (2006). Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up

method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. *AIDS*, 20(7), 967- 973.

- ♥ Kehl, S., Weigel, M., Müller, D., Gentili, M., Hornemann, A., & Sütterlin, M. (2011). HIV- infection and modern antiretroviral therapy impari sperm quality. *Archives of gynecology and obstetrics*, 284(1), 229-233.
- ♥ Kerr, J. (1992). Functional cytology of the human testis. *Baillière's clinical endocrinology and Metabolism*, 6(2), 235-250.
- ♥ Kretser, D., Loveland, K., O'Bryan, M. (2016). Spermatogenesis. En Jameson, L., de Groot, L (Ed). *Endocrinology: Adult and Pediatric* (7^a ed., pp. 2325-2353). Saunders.
- ♥ Kuchakulla, M., Narasimman, M., Khodamoradi, K., Khosravizadeh, Z., Ramasamy, R. (2020). How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity. *Andrologia*, 00, 1-11.
- ♥ Lai, S., Li, R., Yeung, W., & Ng, E. (2018). Effect of paternal age on semen parameters and live birth rate of in-vitro fertilization treatment: a retrospective analisys. *Hong Kong Medical Journal*, 24(5), 444-450.
- ♥ Le, M., Dang, H., Van Nguyen, T., Thi Nguyen, T., Vu Nguyen, Q., & Cao, N. (2022). Effects of sperm preparation techniques on sperm survivability and DNA fragmentation. *Journal of International Medical Research*, 50(5), 1-11.
- ♥ Li, Y., Zhou, L., Lv, M., Ge, P., Liu, Y., & Zhou, D. (2019). Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 233, 84-92.
- ♥ Liu, K., Mao, X., Pan, F., Chen, Y., & An, R. (2023). Correlation analysis of sperm DNA fragmentation index with semen parameters and the effect of the sperm DFI on outcomes of ART. *Scientific Reports*, 13(1), 2717.
- ♥ Liu, T., Gao, J., Zhou, N., Mo, M, Wang, X., Zhang, X., Yang, H., Chen, Q., Ao, L., Liu, J., Cui, Z., & Cao, J. (2016). The effect of two cryopreservation methods on human sperm DNA damage. *Cryobiology*, 72, 210-215.

- ♥ Loloi, J., Petrella, F., Kresch, E., Ibrahim, E., Zini, A., & Ramasamy, R. (2022). The effect of sperm DNA fragmentation on male fertility and strategies for improvement: A narrative review. *Urology*, 00(00),1-7.
- ♥ Mahdavinez, F., Sadighi, M., Gharaei, R., Ashrafnezhad, Z., Valipour, J., Shabani, M., & Amidi, F. (2022). Protective roles of seminal plasma exosomes and microvesicles during human sperm cryopreservation. *RBMO*, 45(2), 341-353.
- ♥ Mann, U., Shiff, B., & Patel, P. (2020). Reasons for worldwide decline in male fertility. *Current opinion in urology*, 30(3), 296-301.
- ♥ Mangiarini, A., Paffoni, A., Restelli, L., Ferrari, S., Guarneri, C., Ragni, G., & Somigliana, E. (2013). Specific sperm defects are differentially correlated with DNA fragmentation in both normozoospermic and teratozoospermic subjects. *Andrology*, 1, 838- 844.
- ♥ Mawhinney, M., & Mariotti, A. (2013). Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontology 2000*, 61, 232-251
- ♥ Mir J., Franken, d., Andrabi, S. (2018). Impact of weight loss on sperm DNA integrity in obese men. *Andrologia* 50(4).
- ♥ Muciaccia, B., Corallini, S., Vicini, E., Padula, F., Gandini, L., Liuzzi, G., Lenzi,A., & Stefanini, M. (2007). HIV-1 viral DNA is present in ejaculated abnormal spermatozoa of seropositive subjects. *Human Reproduction*, 22(11), 2868-2878.
- ♥ Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L. (2019). Sperm DNA fragmentation: Mechanisms of origin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1166, 75-85.
- ♥ Nicopoullou, J., Almeida, P., Ramsay, S., & Gilling-Smith, C. (2004). The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome of intrauterine insemination following sperm washing. *Human Reproduction*, 19, 2289-2297.
- ♥ Nicopoullou, J., Almeida, P., Vourliotis, M., Goulding, R., & Gilling-Smith, C. (2010). A decade of the sperm-washing programme: Where are we now? *Human Fertility*, 13(2), 90-97.

- ♥ Nicopoullou, J., Almeida, P., Vourliotis, M., & Gilling-Smith, C. (2011). A decade of sperm-washing programme: correlation between markers of HIV and seminal parameters. *HIV Medicine*, 12(4), 195-201.
- ♥ O'Brien, J., & Zini, A. (2005). Sperm DNA integrity and male fertility. *Urology*, 65(1), 16-22.
- ♥ Paoli, D., Lombardo, F., & Lenzi, A. (2020). *Atlas of human semen examination*. (pp. 5-6). Springer.
- ♥ Pavili, L., Daudin, M., Moinard, N., Walachaerts, M., Cuzin, L., Massip, P., Pasquier, C., & Bujan, L. (2010). Decrease of mitochondrial DNA level in sperm from patients infected with human immunodeficiency virus-1 linked to nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Fertility and Sterility*, 94, 2151-2156.
- ♥ Pierce, B. (2016). *Genética un enfoque conceptual*. Editorial Medica Panamericana. <http://www.medicapanamericana.com.pbidi.unam.mx:8080/VisorEbookV2/Ebook/9788498357332#{%22Pagina%22:%22IV%22,%22Vista%22:%22Indice%22,%22Busqueda%22:%22%22}>
- ♥ Quintero-Vásquez, G., Bermúdez-Cruz, R., & Castillo-Cadena, J. (2015). Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: un problema actual. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2), 144-151.
- ♥ Restrepo, B., & Cardona, W. (2013). Anticuerpos antiespermatozoides y su asociación con la fertilidad. *Actas Urológicas Españolas*, 37(9), 571-578.
- ♥ Richmond, J., & McKinney, R. (2002). *Bioseguridad en Laboratorios de microbiología y biomedicina*. (4ª ed). Centro de Control y Prevención de Enfermedades.
- ♥ Riva, N., Marcial, C., Martínez, G., Laizzo, R., Artola, M., & Ruhlmann, C. (2016). Análisis comparativo del congelamiento lento y la vitrificación para la criopreservación de espermatozoides. *Reproducción*, 31(1), 7-14.
- ♥ Sadeghi, S., García-Molina, A., Celma, F., Valverde, A., Fereidounfar, S., Soler, C. (2016). Morphometric comparison by the ISAS CASA-DNAf system of two techniques for the evaluation of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 18, 835-839

- ♥ Sauer, M. (2005). Sperm washing techniques address the fertility needs of HIV-seropositive men: a clinical review. *Reproductive BioMedicine Online*, 10(1), 135-140.
- ♥ Sauer, M., & Choi, J. (2006). HIV seroconversion in a woman preparing for assisted reproduction: an inert risk in caring for HIV serodiscordant couples. *Reprodtive Biomedicine Online*, 12, 375-377.
- ♥ Savasi, V., Oneta, M., Laoreti, A., Parisi, F., Parrilla, b., Duca, P., & Cetin, I. (2018). Effects of antiretroviral therapy on sperm DNA integrity of HIV-1-infected men. *American Journal of Men's Health*, 12(6), 1824-1831.
- ♥ Secretaría de Salud. (2003). *Guía para el manejo de los residuos peligrosos biológico infecciosos en unidades de salud*. Secretaría de Salud. https://www.pediatrica.gob.mx/archivos/burbuja/10_Guia_manejo_RPBI.pdf
- ♥ Semprini, A., & Fiore, S. (2004). HIV and reproduction. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 16, 257-262.
- ♥ Shaw, G., Hunter, E. (2012). HIV transmission. *Cold Spring Harb.Perspect. MED*, 2, 1-23.
- ♥ Sikka, S. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 62-85.
- ♥ Smith, L., & Walker, W. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30, 2-13.
- ♥ Stornelli, M., Tittarelli, C., Savignone, C., & Stornelli, M. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, 25(2), 28-35.
- ♥ Tang, L., Ran, M., Yang, W., Yao, Y., Luo, Q., Lu, L., Wang, L., & Zhao, S. (2020). Predictive value of the sperm DNA fragmentation index for low or failed IVF fertilization in men with mild-to-moderate asthenozoospermia. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 50(6), 101868.
- ♥ Taylor, A., Baker, N., Hulsey, M., Bennett, C., Meiners, M., & Gonzales, B. (2019). Evaluating containment effectiveness of A2 and B2 biological safety cabinets. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 76(9): 599-607.

- ♥ Ulubay, M., Ulu, M., & Akdeniz, E. (2022). The effect of aging on semen parameters in normozoospermic men: A cross sectional study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 20(11), 955-962.
- ♥ Uribe, M. (2017). Estudio comparativo sobre la calidad seminal entre la población de jóvenes y adultos en el Departamento de Lima. *Universidad Ricardo Palma*
- ♥ Van Heuvel, Y., Schatz, S., Rosengarten, J., Stitz, J. (2022). Infectious RNA: Human Immunodeficiency Virus (HIV) biology, therapeutic intervention, and the quest for a vaccine. *Toxins*, 14(138), 1-26.
- ♥ World Health Organization. (2010). WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen. 5th ed.
- ♥ World Health Organization. (2020). WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen. 6th ed.
- ♥ World Health Organization. (2022). *HIV/AIDS*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
- ♥ World Health Organization. (2023). *Infertility*. https://www.who.int/es/health-topics/infertility#tab=tab_1
- ♥ Woolhouse, M., Brierley, L. (2018). Epidemiological characteristics of human-infective RNA viruses. *Scientific Data*, 5, 1-6.
- ♥ Yao, H., Li, F., Qiu, X., Xu, Y., Xue, P., & Chang, D. (2020). The effect of varicocele repair for sperm DNA fragmentation. *Medicine*, 99, 1-5.
- ♥ Zhang, S., Tao, W., Han, J. (2022). 3D chromatin structure changes during spermatogenesis and oogenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 2434-244.

14. ANEXOS.

Consentimiento informado para realizar lavado seminal para muestras con VIH.

Consentimiento informado para llevar a cabo técnicas de reproducción asistida en parejas serodiscordantes para VIH (varón VIH +).

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LLEVAR A CABO TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN PAREJAS SERODISCORDANTES PARA VIH (VARÓN VIH +)

Fecha: _____

Sra. _____

DE _____ AÑOS DE EDAD, CURP _____

Y DOMICILIO EN _____

Sr _____

DE _____ AÑOS DE EDAD, CURP _____

Y DOMICILIO EN _____

Los pacientes abajo firmantes constituimos una pareja en que el varón presenta anticuerpos VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana, en adelante VIH) positivos, siendo la mujer negativa para dichos anticuerpos. Expresamos la voluntad de tener descendencia y por este motivo queremos ser incluidos en el Programa de Reproducción asistida con semen tratado para parejas serodiscordantes para VIH.

Estamos conscientes de que conseguir una gestación en nuestro caso, por medio de relaciones sexuales, comporta un riesgo de transmisión del VIH. Hemos sido informados de que se han desarrollado técnicas de procesamiento de las muestras de semen en el laboratorio y de reproducción asistida que consiguen reducir la presencia de VIH en semen y por tanto, minimizar considerablemente el riesgo de transmisión.



Consentimiento informado para llevar a cabo técnicas de reproducción asistida en parejas serodiscordantes para VIH (varón VIH +).

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, y el hecho de que la fiabilidad de las técnicas utilizadas (procesamiento de muestras y técnica de detección de VIH en semen) no alcanza el 100% y habiendo sido informados de otras alternativas existentes para conseguir embarazo (técnicas de reproducción asistida utilizando semen de donante), aceptamos libremente la responsabilidad del mínimo riesgo de contagio que pueda derivarse de la práctica de dicha técnica.

Para descartar toda posibilidad de seroconversión, la paciente se compromete a realizar, tanto si se consigue el embarazo como si no se consigue, una determinación de VIH en sangre en los tiempos que el médico indique. Además, en caso de embarazo, adquirimos el compromiso de realizar en la mujer una determinación de anticuerpos VIH cada tres meses hasta el parto. Una vez nacido el bebe, asumimos el compromiso de realizar la prueba de VIH tanto al bebe como a la madre del mismo cada 3, 6 y 12 meses posteriores al parto.

Manifestamos por tanto con nuestra firma la voluntad de ser sometidos a una técnica de reproducción asistida utilizando semen previamente tratado en el laboratorio y testado para los anticuerpos de VIH.

Hemos comprendido las explicaciones que se nos han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, tanto el médico como el biólogo que nos ha atendido nos ha permitido realizar todas las observaciones y nos ha aclarado todas las dudas que le hemos planteado. La información nos ha sido facilitada con anticipación suficiente para que podamos reflexionar con calma y decidir libre y responsablemente, y nos ha sido comunicada 24 horas antes del procedimiento de referencia. También comprendemos que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, podemos revocar el consentimiento que ahora prestamos. Por ello, manifestamos que estamos satisfechos/as con la información recibida y que comprendemos el alcance y los riesgos del tratamiento.

**Consentimiento informado para llevar a cabo técnicas
de reproducción asistida en parejas serodiscordantes
para VIH (varón VIH +).**

**VARÓN CON INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA
(VIH)**

(Cuestionario confidencial a rellenar por el médico responsable)

- 1.- Edad:

- 2.- Vía de contagio (si conocida):

- 3.- Tiempo de evolución de la enfermedad:

- 4.- Estadío clínico-inmunológico:

- 5.- Clínica actual:

- 6.- Carga viral (copias ARN/ml) actual o última (con fecha):

- 7.- Nivel de CD4/mm³ actual o último (con fecha):

- 8.- Patologías o toxicomanías asociadas (previas o actuales):

Consentimiento informado para llevar a cabo técnicas de reproducción asistida en parejas serodiscordantes para VIH (varón VIH +).

Autorización:

Autorizamos libremente a la clínica de reproducción asistida, a proceder con cualquier técnica de reproducción asistida que necesite con el objetivo de conseguir un embarazo.

En _____ a _____ de _____ de _____

Firma de la paciente

Firma del paciente

Firma del Médico

Firma del testigo

El presente Consentimiento deberá estar firmado por los pacientes en TODAS sus hojas y por ambas caras.

Consentimiento informado para llevar a cabo técnicas de reproducción asistida en parejas serodiscordantes para VIH (varón VIH +).

9.- Tratamiento antirretroviral actual (combinación de fármacos, dosis diaria y tiempo de administración):

10.- Cumplimiento del tratamiento antirretroviral (señalar):

Siempre () Frecuente () (especificar):

Ocasional (especificar) () Nunca ().

11.- Otros tratamientos recibidos (antibióticos, antivirales, profilaxis, vacunas, etc).

12.- Afectación genital conocida o previa (indicar tipo y momento): Uretritis, orquitis, epididimitis, herpes, sífilis, gonococia, condilomatosis, molusco contagioso, chancroide, etc.

Nombre del médico:

Firma:

Constancia de presentación del trabajo en el 59 Congreso Mexicano de Medicina de la Reproducción de la AMMR.



**ACAPULCO,
GUERRERO,**
Hotel Palacio Mundo Imperial
19 AL 22 DE JULIO, 2023

Otorga la presente

CONSTANCIA

a

Biól. Ka s a n d r a Viridia na Arroyo Flores

Por su participación como Autor en la presentación de CARTELES, que se llevó a cabo durante el:

59 Congreso Mexicano de Medicina de la Reproducción
del 19 al 22 de julio de 2023, en Acapulco, Guerrero.

con el tema: **Evaluación de la fragmentación de ADN en muestras seminales de pacientes infectados con VIH**
Avalado por el Consejo Mexicano de Ginecología y Obstetricia para la vigencia de Certificación con 10 puntos.

Acapulco, Guerrero, 22 de julio de 2023.



CE#95-23

Dr. Álvaro Sánchez Morales
Presidente Ejecutivo

Dra. Rosa Mariana Luna Rojas
Coordinadora del Comité Científico

Dr. José María Mojara Estrada
Secretario AMMR