

Correlación del porcentaje de fragmentación de ADN espermático en el diagnóstico de infertilidad masculina

Alfredo Góngora Rodríguez,* Lyda Yuliana Parra Forero**

RESUMEN

Antecedentes: La determinación del porcentaje de fragmentación de ADN espermático se ha convertido en una de las pruebas de rutina de muchos laboratorios debido a su correlación con el diagnóstico de fertilidad en hombres. Se han determinado muchas causas para su aumento, como la alteración en los procesos de apoptosis y espermatoformación. En humanos y animales, se han reportado variaciones en los índices hasta llegar a una respuesta individual; sus consecuencias son variadas y dependerán de la severidad del grado del daño ocasionado en el ADN. **Objetivo:** Determinar los porcentajes de fragmentación con la técnica de dispersión de cromatina en pacientes con historial de algún problema para concebir del Centro de Fertilidad Humana en México. **Material y métodos:** Se analizaron 268 espermatoziobiopsias con evaluación de cromatina nuclear espermática. **Resultados:** Hubo diferencias significativas ($p > 0.0001$) entre pacientes normozoospérmicos, hipospérmicos, oligozoospérmicos, oligoastenozoospérmicos, teratozoospérmicos y astenoteratozoospérmicos. Los resultados variaron según el diagnóstico y se evidenció un aumento significativo cuando aumentaban las anomalías de los parámetros de la espermatoziobiopsia. **Conclusión:** El porcentaje de fragmentación de ADN espermático aumenta con el hallazgo de anomalías en la espermatoziobiopsia, encontrándose correlación con el aumento de anomalías morfológicas y la disminución en la motilidad espermática.

Palabras clave: Fragmentación de ADN, cromatina, espermatozoide.

Nivel de evidencia: III.

Correlation of percentage of sperm DNA fragmentation in the diagnosis of male infertility

ABSTRACT

Background: The determination of the percentage of sperm DNA fragmentation has become a routine test of many laboratories due to its correlation with the diagnosis of fertility in men. Many causes have been determined for its rise, like the alteration in the processes of apoptosis and spermatogenesis. In human beings and animals, variations in the rates have been reported, until coming to an individual response; there are several consequences and they depend on the severity of the damage caused in the DNA. **Objective:** To determine the percentage of fragmentation with the chromatin dispersion technique in patients with a history of problems to conceive of the Human Fertility Center in Mexico. **Material and methods:** 268 espermatoziobiopsies were analyzed with sperm nuclear chromatin evaluation. **Results:** There were significant differences ($p > 0.0001$) between normozoospermic, hipospérmic, oligozoospermic, oligoastenozoospermic, teratozoospermic and astenoteratozoospermic patients. The results changed according to the diagnosis, and a significant increase was demonstrated when abnormalities of the parameters of the espermatoziobiopsia increased. **Conclusion:** The percentage of sperm DNA fragmentation increases with the finding of abnormalities in the espermatoziobiopsia; we found correlation with the increase of morphologic abnormalities and the decrease in spermatic motility.

Key words: DNA fragmentation, chromatin, spermatozoa.

Level of evidence: III.

* Ginecología y Obstetricia. Biología de la Reproducción.

** Médico Veterinario. Reproducción Humana y Animal.

Recibido para publicación: 11/11/2013. Aceptado: 27/01/2014.

Correspondencia: Dra. Lyda Yuliana Parra Forero

Centro de Fertilidad Humana en México. Tuxpan Núm. 6, cuarto piso, Col. Roma.

Teléfonos: 55649238, 55749186, 55744677

E-mail: investigacion@centrodefertilidad.com

Abreviaturas:

ASTENO = Astenoteratozoospérmicos.

EEM = Error estándar de la media.

HIPO = Hipospérmico.

NORM = Normozoospérmicos.

OATS = Oligoastenozoospérmicos.

OLIGO = Oligospérmicos.

PFE = Porcentaje de fragmentación de ADN espermático.

TERATO = Teratozoospérmicos.

INTRODUCCIÓN

La fertilidad masculina en el mundo ha tenido una disminución sustancial, afectando cerca del 20% de las parejas que se encuentran en edad reproductiva;^{1,2} la tasa de embarazo por relación sexual de una pareja normal se encuentra entre un 20-25% por mes, 75% en seis meses y 90% en un año. En parejas subfértiles e infértils, el factor masculino está involucrado cerca de un 50%;³ en México no hay estadísticas concretas sobre este índice. Las causas de infertilidad han sido estudiadas y adjudicadas a varios motivos, entre ellos, costumbres alimenticias y sociales, exposición a factores ambientales y administración de ciertos fármacos, sin dejar atrás los ya conocidos, como la exposición a agentes radioactivos y otros que se encuentran en el cuadro I.

Las causas de la fragmentación del ADN son muchas y muchos factores influyen: el ambiente intra-testicular y extratesticular es uno de ellos;⁴ las alteraciones del ADN pueden identificarse y ser señaladas durante la espermatogénesis, siendo un proceso irreversible para la célula en diferenciación; muchas

de éstas se deben a los procesos normales de selección y exclusión.⁵ Pacientes con tratamientos oncológicos son potencialmente susceptibles a ser infértils después o durante el tratamiento, por lo que debe considerarse la criopreservación temprana para la preservación de sus gametos.⁶⁻⁸ El daño del ADN dependerá de las anormalidades que se den en el proceso de espermatogénesis, como la deficiencia en protamina-ción, provocando alteración en la compactación de la cromatina. El aumento desproporcionado de formación de radicales libres altera el ambiente testicular, provocando que los procesos apoptóticos normales se disminuyan, dejando así células inmaduras y de baja calidad en el eyaculado. La exposición a tóxicos medioambientales como la polución y otros agentes tóxicos como organoclorados y organofosforados han sido vinculados en la presentación de alteraciones en el ADN correlacionadas con problemas de infertilidad. Terapias agresivas con radioterapia y quimioterapia están siendo estudiadas para evaluar su efecto adverso sobre estas células debido a su acción directa sobre el ciclo celular, que afecta de alguna manera a las células sanas, en este caso, las germinales. Otras pato-

Cuadro I. Factores influyentes en la fragmentación de ADN espermático.

Autor	Objeto de respuesta	Fragmentación reportada	Características de muestra	Significancia estadística
Selevan S et al., 2000 ⁹	Exposición a polución	19.2 ± 12.2% 16.2 ± 9.3% 28.8 ± 20.4%	Exposición baja Exposición media Exposición alta	*p < 0.05
Ménézo Y et al., 2007 ¹⁰	Tratamientos con antioxidantes	Pretratamiento 32.4% Postratamiento 26.2%	58 pacientes con 90 días de tratamiento	**p < 0.001
Vagnini L et al., 2007 ¹¹	Edad	15.7 ± 10.2% 18.2 ± 11.3% 18.3 ± 11%	≤ 35 años 36-39 años ≥ 40	p = 0.034 p = 0.022 No hubo diferencias
Elshal M et al., 2009 ¹²	Asociación con pacientes fumadores	37.66 ± 4.03% 19.34 ± 7.13% 14.51 ± 4.91%	Infértils fumadores 34 Infértils no fumadores 36 Fumadores fértils 16	*p < 0.05
Gosálvez J et al., 2009 ¹³	Abstinencia	3 horas: 19.6 ± 8.4%, 10.8 ± 6.3% 96 horas: 17.0 ± 5.5%, 22.2 ± 7.4%	Donadores con problemas de fertilidad 21; Donadores de semen 12	*p < 0.05
Meseguer M et al., 2006 ¹⁴	Azoospermia	46.92% (EEM = 4.47) 35.96% (EEM = 2.63)	Azoospermia no obstructiva 22 Azoospermia obstructiva 36	*p < 0.05
Pelliccione F et al., 2011 ¹⁵	Pre- y postejerercicio	Pre: 6.0 (4.7-8.0)%; Post: 6.0 (5.6-6.4) %	Donadores sanos 7	*p < 0.05
Avendaño C et al., 2012 ¹⁶	Uso de laptop e internet	8.3 ± 6.6%	Donadores sanos 29 Exposición 4 horas	*p < 0.05
Santiso R et al., 2012 ¹⁷	Exposición a quelantes de ADN	14.01-20.76% 4.23-21.46% 5.05-21.46% 2.14-20.71%	Exposición a radiación (rayos X) Hipertermia Exposición a pH ácido Exposición a óxido nítrico	**p < 0.001 **p < 0.001 ***p < 0.001 ***p < 0.001
Dupont C et al., 2013 ¹⁸	Obesidad	13% (10-15) 13% (7.4-19) 13% (13-21.9)	Pesos normales 141 Sobrepeso 137 Obesidad 43	No hubo diferencias

logías también han sido correlacionadas con el daño del ADN espermático; enfermedades o circunstancias que conlleven hipertermia a nivel celular, varicocele y desórdenes hormonales son, entre otras, causas de daño en el ADN (*Cuadro I*).

El incremento de pacientes y de diagnósticos acercados en un tiempo menor hace que se aumente la implementación de nuevas pruebas que complementen los resultados del espermograma convencional. La evaluación directa sobre el ADN de los gametos ha sido reportada y su uso es de amplio conocimiento a nivel mundial. La evaluación de la fragmentación del ADN espermático estará incluida en la evaluación de eyaculados de una manera cotidiana. Hay varias maneras de evaluar esta condición; entre las técnicas más utilizadas están TUNEL (del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-dUTP nick-end labeling*) y el ensayo de COMETA;¹⁹ éstas requieren de equipos especializados y de alto costo. Una de las más sencillas pero con alta sensibilidad es la que se basa en el fenómeno de dispersión de cromatina o SCD (HaloSperm®), ampliamente utilizada en humanos y animales, basándose en la propiedad de desnaturalización del ADN. Esta prueba nos permite definir el grado de fragmentación del paciente. El umbral del límite patológico, es decir, el porcentaje mínimo admitido para concebir en humanos, aún no está definido; los resultados han sido controversiales debido a las diferencias de los estudios y a la variabilidad de repuestas a los tratamientos. Para la técnica SCSA, reportan un 30%;²⁰ en TUNEL se encuentran más diferencias, variando entre el 12²¹ y 36.5%, estableciéndose un 20% como

probable rango mínimo en espermatozoides seleccionados con técnicas de reproducción asistida.

La severidad de las consecuencias del daño sobre el ADN espermático se basará en el tipo de rotura, si es de cadena doble o sencilla –lo que puede ser diagnosticado por TUNEL-. La severidad de este daño dependerá del lugar donde se dé la ruptura, ya que puede involucrar información de genes vitales;²²⁻²⁴ esto puede interrumpir cualquier proceso desde la fertilización o provocar daños congénitos en el feto, ya que todos éstos se dan por la expresión de genes que, al estar delecionados, no se dará. El porcentaje de reparación que puede hacer el ovocito es de cerca de un 75%, lo que garantiza una mayor probabilidad de fertilización y de embarazos al término. La evaluación de ADN en ovocito no ha sido tan bien estudiada y sus resultados son contradictorios; el predecir el daño de ovocitos sin dañarlo será la manera más viable y adecuada para la selección de gametos para técnicas de reproducción asistida.^{19,25,26}

Actualmente, los estudios están encaminándose en aumentar las tasas de embarazo con la aplicación de técnicas especializadas como la fertilización *in vitro* y la inyección intracitoplasmática. Los resultados son diversos y controversiales respecto al manejo de semen con alto índice de fragmentación espermática –algunos se señalan en el *cuadro II*–; debido a esto, la selección espermática previa a cualquiera de estas técnicas es fundamental para evitar la fecundación de ovocitos viables con espermatozoides con daño en el ADN y cumplir con el objetivo de transferir un embrión viable y con calidad, evitando la aparición de alguna de las consecuencias señaladas anteriormente (*Cuadro II*).

Cuadro II. Tasas de embarazos utilizando semen con diferente porcentaje de fragmentación de ADN espermático.

Autor	Técnica	Porcentaje de fragmentación espermática (%)	% Embarazos		
			Fertilización <i>in vitro</i> (%)	ICSI (%)	Significación estadística
Virro MR et al., 2004 ²⁷	SCSA	< 30	47	NR	0.05
		> 30	28		
Payne JF et al., 2005 ²⁸	SCSA	< 9	8.7	NR	NS
		9-18	40.6		
		18-27	33.3		
		27-36	54.5		
		> 36	37.6		
Benchab M et al., 2007 ²⁹	TUNEL	< 15	35.7	37.4	NS
		> 15	31.8	27.8	
Lin MH et al., 2008 ³⁰	SCSA	< 9	82.10	79.58	NS
		9-27	84.87	77.81	
		> 27	84.74	79.84	

NR = no reportado, NS = no hubo diferencias significativas.

La OMS (Organización Mundial de la Salud; WHO por sus siglas en inglés: *World Health Organization*) ha publicado varios manuales tratando de establecer la correcta evaluación del semen con el fin de uniformar los resultados. Aun así, algunos estudios reportan diferencias significativas respecto a los valores de la OMS del año 2010.²⁸⁻³¹ Respecto a la utilización clínica de los valores reportados por los laboratorios de fragmentación de ADN espermático, la guía de la Sociedad Americana de Medicina de la Reproducción reporta que no hay una relación consistente con tasas de embarazo, pero rescata su utilidad y menciona su viabilidad para futuras técnicas de reproducción asistida.³²

El objetivo de este estudio es comparar los resultados de los espermogramas de 270 pacientes y compararlos con los valores de referencia de la OMS, además, determinar el porcentaje de fragmentación de ADN espermático en pacientes del Centro de Fertilidad Humana en México y correlacionar su diagnóstico con el espermograma convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Este estudio prospectivo se realizó con la evaluación de los resultados de pacientes del Centro Humano de Fertilidad en México desde el año 2009, quienes fueron diagnosticados por resultados de espermogramas convencionales basados en la OMS, y a quienes se les realizó la prueba de SCD para la determinación del índice de fragmentación espermática.³¹ Los pacientes fueron divididos en cinco grupos con los siguientes diagnósticos: normales (NORM) –cuando todos sus rangos estaban acordes con los parámetros descritos en el manual de la OMS–, hipospérmicos (HIPO), oligospérmicos (OLIGO), oligoastenozoospérmicos

(OATS), teratozoospérmicos (TERATO) y asteno-teratozoospérmicos (ASTENO). En el cuadro III se muestran los cambios realizados en las ediciones de los manuales de la OMS.

Análisis estándar de semen

La obtención de la muestra se realizó por masturbación y con 48 a 72 horas de abstinencia. Se incubó a 37 °C hasta su licuefacción total; se realizó su concentración y la evaluación de la motilidad; la morfología se determinó con la tinción de Diff-Quick, considerando normal a aquel espermatozoide que no presentara gotas citoplasmáticas en ninguna parte y cuyo acrosoma estuviera cubriendo mínimo el 70% de la cabeza.

Según los resultados de la espermatobioscopia, se diagnosticaron de la siguiente manera: normales, cuando la concentración de espermatozoides fue mayor a 20 x 10⁶ espermatozoides por mL, su motilidad fue mayor al 50%, o que al menos un 25% de los espermatozoides tuvieran motilidad progresiva lineal y más del 30%, morfología normal, siempre conservando la temperatura en la evaluación a 37 grados Celsius; astenozoospérmicos, cuando el eyaculado tuvo menos del 40% de espermatozoides con motilidad progresiva; teratozoospérmicos, cuando hubo una morfología normal menor al 30%; oligozoospérmicos, cuando la concentración espermática fue menor a 20 x 10⁶ espermatozoides/mL, y oligoastenozoospérmicos, cuando tuvieron reducidas su concentración y motilidad.³³

Análisis de fragmentación del ADN espermático

Para el análisis de la estructura del ADN espermático, se utilizó el kit Halosperm®, que se basa en la dispersión de la cromatina del espermatozoide des-

Cuadro III. Comparación de los valores de referencia de los manuales publicados por la OMS (Organización Mundial de la Salud).

Parámetro	OMS, 1992	OMS, 1999	OMS, 2010
Volumen	≥ 2 mL	≥ 2 mL	1.5 mL
Concentración espermática/mL	≥ 20 x 10 ⁶ /mL	≥ 20 x 10 ⁶ /mL	≥ 15 x 10 ⁶ /mL
Concentración espermática total	≥ 40 x 10 ⁶	≥ 40 x 10 ⁶	≥ 39 x 10 ⁶
Motilidad total (%)	≥ 50	≥ 50	≥ 40
Motilidad progresiva ¹	≥ 25% (grado a)	≥ 25% (grado a)	32% (a + b)
Vitalidad (% de vivos)	≥ 75	≥ 75	58
Morfología	≥ 30%	14%	4% ²
Recuento leucocitario	< 1.0 x 10 ⁶ /mL	< 1.0 x 10 ⁶ /mL	< 1.0 x 10 ⁶ /mL

¹Grado a: motilidad progresiva aumentada (> 25 μm/s); grado b: motilidad progresiva reducida (5-25 μm/s); normal 50% (grado a + b) o 25% en grado a con 60 minutos después de la eyaculación.

²Evaluados según el estricto criterio de Tygerberg (Kruger).

pués de estar en contacto con una solución desnaturalizante; éste se basa en la medición de los halos que se pueden observar tanto en campo claro como con el uso específico de florocromos como el DAPI y el SybrGreen, que se intercalan entre las hebras del ADN, siendo más específico su valor diagnóstico (*Figura 1*).^{34,35} En las muestras se evaluaron 300 células por eyaculado, en microscopio de fluorescencia marca OPTYSUM Mic 990 OLYMPUS, teñidas con Diff-Quick®, leídas en 100x y evaluadas en 400x.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Minitab® versión 16.1. Se realizó la prueba de χ^2 para analizar los parámetros de calidad del espermograma. Las diferencias entre grupos se evaluó mediante

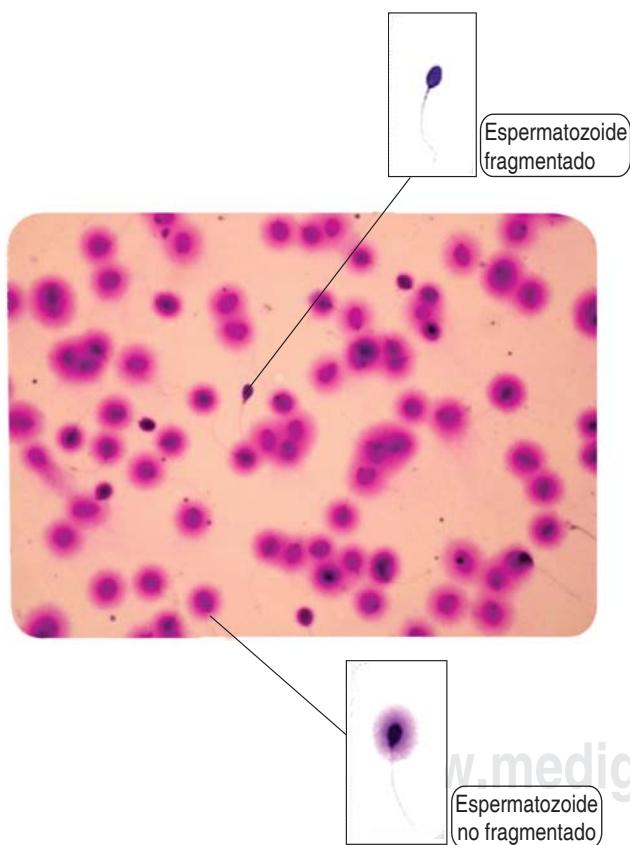


Figura 1. Lectura en campo claro de halos de dispersión de cromatina teñidos Diff-Quick®.

Foto tomada de paciente normozoospérmico con bajo porcentaje de fragmentación. En la parte superior, se evidencia el diagrama de un espermatozoide que no muestra halo, diferenciándose ampliamente con los normales, como en el que se encuentra en la parte inferior.

ANOVA de una vía. Las correlaciones se realizaron con Sperman. Los resultados se consideraron significativamente representativos $p < 0.0001$.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran que los parámetros normales de espermatobioscopia mostraron diferencias significativas ($p > 0.0001$) en el recuento total de espermatozoides, en la morfología y el índice de fragmentación espermática; estos resultados se muestran en el *cuadro IV*, mostrando diferencias respecto al diagnóstico.

Nosotros comparamos los resultados de morfología, que fue el parámetro con mayor correlación –aunque no significativa– con los parámetros de la OMS respecto al diagnóstico y a la separación por tipo de anormalidad seminal; éstos muestran diferencias evidentes en el *cuadro V*.

Adicionalmente, realizamos correlaciones con cada uno de los parámetros de la espermatobioscopia y el porcentaje de ADN espermático, y no se encontró ninguna correlación significativa, siendo mayor la encontrada en motilidad ($r = 0.185$, $p = 0.124$) y morfología ($r = 0.239$, $p = 0.133$).

DISCUSIÓN

Hay muchos factores que influyen en el éxito de la reproducción humana; entre ellos está la fragmentación de ADN espermático, la cual está ampliamente reportada como perjudicial para la fertilidad del hombre; se ha establecido su evaluación, en el caso de SCD, como una respuesta fija a algún evento clínico, tóxico, experimental o de otro factor en el cual el espermatozoide, de forma indirecta, se vuelve un indicador de citotoxicidad extrapolable a un evento fisiológico normal y/o anormal, según el caso.³⁶⁻³⁸

El presente estudio evidenció una alta correlación con el diagnóstico de los pacientes con espermatobioscopia anormales respecto a las características evaluadas por la OMS. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Oliveira y colaboradores (2010),³⁹ que reportan que eyaculados con bajo índice de fragmentación coincidían con muestras de espermatozoides de pacientes normospérmicos y seleccionados; aun así, hay correlación negativa con los diámetros de las cabezas, lo que indicaría el uso de espermatozoides con fragmentación de ADN pero con una morfología aparentemente normal.⁴⁰ También entra en discusión la comparación de la estructura de la cromatina, donde un espermatozoide

compacto y sin halo se considera fragmentado, pero pasa inadvertido en una espermatobioscopia normal; este estudio comparativo se ha desarrollado utilizando técnicas de separación como el TUNEL, donde se ratifica esta afirmación.^{41,42} La identificación de cromatinas anormales ha sido reportada usando microscopia electrónica y de barrido; éstas identifican alteraciones y presencia de organelos celulares con daño estructural; un ejemplo es la correlación positiva donde de muestra que la aparición de vacuolas 50% más grandes que el área nuclear tiene mayor índice de fragmentación de ADN espermático que otras con menor tamaño.⁴³

Los diagnósticos explícitos por la OMS son un indicativo de fallas en la espermatogénesis y deben verse como un proceso de selección. La apoptosis se encarga del equilibrio; si éste falla, la cascada de la espermatogénesis también lo hace, y se ha reporta-

do que cuando esto sucede, las más afectadas son las etapas más tempranas –espermátides y espermato-
gonias–, ocasionando un daño progresivo e irreversible.⁴⁴ Es interesante observar una variación importante en los parámetros normales de morfología reportados por la OMS y los encontrados en el centro estudiado; aunque algunos de ellos no se ajustan, la población tiende a ellos, dependiendo exclusivamente de la población estudio.

En investigaciones realizadas en pacientes azoospermáticos, se determinó el índice de fragmentación de pacientes con y sin daño obstructivo, y se encontró que espermatozoides testiculares tiene menor daño en ADN que cuando tienen un proceso de espermato-
génesis normal; esto está en cuestionamiento, ya que el *test* de dispersión de cromatina evidencia el daño con la no formación de halos; cabe mencionar que muchas de las células testiculares se encuentran

Cuadro IV. Resultados de parámetros seminales de pacientes.

Pacientes	NORM (n = 168)	HIPÓ (n = 8)	OLIGO (n = 6)	OATS (n = 21)	TERATO (n = 41)	ASTENO (n = 26)	p
Edad (años)	38.23 ± 0.45	39.88 ± 2.81	34.43 ± 1.65	36.23 ± 1.10	37.43 ± 0.92	38.27 ± 1.34	0.005
Abstinencia (días)	4.04 ± 0.18	3.25 ± 0.41	3.0 ± 0.38	4.04 ± 0.28	5.28 ± 1.09	4.0 ± 0.27	0.005
Volumen seminal (mL)	2.47 ± 0.10	0.81 ± 0.11	2.53 ± 0.34	3.09 ± 0.28	2.99 ± 0.18	2.99 ± 0.39	0.0001
pH seminal	7.96 ± 0.02	7.9 ± 0.13	8.0 ± 0.13	8.02 ± 0.07	7.83 ± 0.09	8.0 ± 0.03	0.002
Recuento total de espermatozoides (x 10 ⁶)	90.17 ± 5.48	42.13 ± 7.68	18.29 ± 5.38	47.45 ± 6.35	129 ± 12.1	123.5 ± 20	< 0.0001
Motilidad espermática (grado a + b) (%)	52.59 ± 1.51	48.75 ± 9.22	46.71 ± 7.59	51.68 ± 4.24	68.75 ± 3.24	45.19 ± 4.42	< 0.0001
Porcentaje fragmentación espermática	18.41 ± 1.16	51.6 ± 14.4	56.9 ± 15.6	65.09 ± 8.0	60.60 ± 6.14	58.69 ± 7.15	0.0001

NORM = normales, HIPÓ = hipospérmicos, OLIGO = oligozoospérmico, OATS = oligoastenozoospérmicos, TERATO = teratozoospérmicos, ASTENO = astenoteratozoospérmicos. Se consideraron estadísticamente significativos p < 0.001

Cuadro V. Comparación de resultados de morfología con valores de referencia de la OMS.

Pacientes	NORM (n = 168)			HIPÓ (n = 8)			OLIGO (n = 6)			OATS (n = 21)			TERATO (n = 41)			ASTENO (n = 26)		
Anormalidades	OMS	CFHM	p															
Normales (%)	29 ± 8 (1.62)	33.1	0.001	29 ± 8 (7.04)	17.9	0.001	26 ± 9 (5.06)	27.2	0.072	13 ± 7 (5.25)	34	0.001	13 ± 7 (3.06)	13.5	0.086	24 ± 9 (4.27)	21	0.023
Anormalidades de cabeza (%)	74 ± 4 (1.62)	41.8	0.001	74 ± 4 (7.68)	62.5	0.001	69 ± 2 (4.79)	14.9	0.001	65 ± 7 (6.4)	42.3	0.001	65 ± 7 (2.93)	56.6	0.001	68 ± 4 (1.01)	47	0.001
Anormalidades de cuello y pieza media (%)	12 ± 3 (0.70)	14.4	0.551	12 ± 3 (0.93)	10.4	0.341	14 ± 2 (1.78)	16.7	0.722	14 ± 3 (2.78)	12.3	0.589	14 ± 3 (1.35)	15.9	0.677	15 ± 3 (1.92)	17.9	0.964
Anormalidades de cola (%)	12 ± 3 (0.53)	10.7	0.002	12 ± 3 (1.13)	6.3	0.002	15 ± 2 (2.15)	13.6	0.005	19 ± 4 (1.32)	10.3	0.005	19 ± 4 (1.31)	13.1	0.005	15 ± 3 (1.89)	13.9	0.005

NORM = normales, HIPÓ = hipospérmicos, OLIGO = oligozoospérmico, OATS = oligoastenozoospérmicos, TERATO = teratozoospérmicos, ASTENO = astenoteratozoospérmicos. OMS = Organización Mundial de la Salud, CFHM = Centro de Fertilidad Humana en México.

Se consideraron estadísticamente significativos p < 0.001

en distintas fases y su compactación varía, además de que, por procesos de ubiquitinación, la desnaturización de cromatina se altera y no se da, arrojando falsos negativos que afectan la prueba.^{19,45} Indiscutiblemente, cualquier daño a nivel testicular afectará de forma radical la fertilidad del paciente. Los espermatozoides con daño en el ADN pueden fertilizar y dar embriones de calidad excelente; sin embargo, se han reportado tasas bajas de fertilización con el uso de éstos.³² En más pacientes con problemas de fertilidad y alto grado de fragmentación de ADN, son los principales candidatos para la realización de ICSI; aun así, su uso es preocupante por las altas posibilidades de pérdidas gestacionales, malformaciones y hasta pérdida de gestaciones avanzadas, consecuencia de mutaciones provocadas por delecciones, desmetilaciones activas de pronúcleos, entre otras que alteran de forma drástica la transcripción. Esto sugiere que la calidad de un embrión dado por un espermatozoide con ADN fragmentado dependerá del daño de éste, por lo que será más grave en caso de una ruptura de doble cadena.

La diferencia que existe entre las anormalidades de la espermatobioscopia con los resultados de fragmentación de ADN genera tranquilidad en la manera de determinar si una muestra es de calidad o no. En otras pruebas como la evaluación exhaustiva del estado del acrosoma, está reportada su correlación; sin embargo, la separación de espermatozoides con daño acrosomal aún no está clara: la utilización de colorantes que afectan definitivamente la célula es una dificultad que debe sustituirse en el tiempo. Se espera el avance de más estudios sobre el proceso que requeriría el hecho de selección *in situ* de células de baja calidad para procedimientos únicos como el ICSI, entre otros, ya que la selección uterina que existe en el interior del sistema femenino se omite en estos protocolos o se recurre a métodos de capacitación inespecíficos.

La capacidad de reparación del ovocito se evidencia con los estudios que muestra el *cuadro II*. Estos trabajos son importantes, ya que hacen necesario desarrollar parámetros de evaluación de daño de ADN en ovocito para poder definir el cultivo o no de éstos desde temprana edad y así priorizar de una manera menos subjetiva –como la evaluación morfológica que se hace en la mayoría de centros de reproducción asistida–; estos estudios no han sido bien discutidos en humanos. Estudios señalan que las primeras etapas de los embriones eran dependientes del ovocito y que sólo hasta cuando llegaba a más de seis células, la influencia del ADN paterno determinaba la super-

vivencia del embrión. Sin embargo, con el descubrimiento del genoma, se sabe ahora que esto no es tan sencillo y que la influencia paterna es necesaria en el embrión temprano. Hay reportes que indican que la pérdida previa a la implantación ocurre entre la activación del genoma y la etapa del blastocisto.⁴⁶⁻⁴⁸

CONCLUSIÓN

Las correlaciones de la fragmentación de ADN con otros parámetros de la espermatobioscopia tradicional han sido ampliamente reportadas; en las que factores como la edad⁴⁹ y la morfología espermática⁵⁰ se consideran como indicadores en la presentación de altos índices de daño en el ADN espermático. Otros factores como la exposición a químicos, a la polución y el tabaquismo están siendo vinculadas de manera directa al daño del ADN.^{17,21,51} En México, como en la mayoría de los países latinoamericanos, los estudios para determinar las causas del aumento del porcentaje de espermatozoides afectados son limitados y pocos que se hacen, atribuyen este efecto a enfermedades de índole reproductivo, pero ninguno de estos han tenido resultados contundentes que demuestren estas afirmaciones.

Se necesitan más estudios que permitan determinar las causas de los altos niveles de fragmentación de pacientes con espermatogénesis defectuosa. Actualmente, los estudios van encaminados en la detección de concentración de ROS en eyaculados, al igual que las terapias con antioxidantes y programas de mejoramiento nutricional adicionando minerales como el zinc, cofactor principal de más de 300 metaloenzimas para procesos fisiológicos esenciales para la vida.⁵² Al igual que el espermatozoide, el ovocito toma un papel protagónico; los reportes de tasas de reparación de más del 70% en el momento de la fecundación hacen prioritario definir la manera de establecer indicadores que proporcionen información de la estructura de su ADN,²⁵ sin ocasionarle daño.

Según nuestros resultados, es necesario recomendar a los hombres con aspiraciones de ser padres o a los pacientes oncológicos realizarse un espermograma completo determinando el índice de fragmentación de ADN espermático, obteniendo un resultado de calidad y una recomendación. En el caso de tener un alto índice, debe contemplarse la opción de adelantar o no este deseo, o –en el peor de los casos– la posibilidad de realizar una técnica de reproducción asistida (desde criopreservación hasta ICSI) para alcanzar un embarazo. Desafortunadamente, en México son tantos y tan

variados los factores que deben estar influyendo, que es difícil determinar las causas del aumento del índice de fragmentación, mismas que no se pueden corregir si se desconocen; por eso la importancia de realizarse estos estudios de manera preventiva y considerar la fragmentación un problema de salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Augeret J, Gordon-Baker HW, Behre HM et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*. 2010; 16: 231-245.
- Serrano RT. Una visión actual de la infertilidad masculina. *Rev Mex Reprod*. 2012; 4: 103-109.
- Rodríguez AG, González SS, García SC, Pareto SC. Fragmentación del ADN del espermatozoide y su influencia en la fertilidad de la pareja. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. 2011; 3: 106.
- Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Human Reproduction*. 2005; 20: 3476-3480.
- Álvarez JG. Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Revista Internacional de Andrología*. 2007; 5: 354-363.
- Sakkas D, Álvarez JG. Fragmentación del ADN espermático: mecanismos de origen, repercusión en los resultados reproductivos y análisis. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. 2011; 3: 160.
- Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Pasquale P, Hamish WW, Karen H et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 24: 2917-2931.
- Quinn GP, Vadaparampil ST, Gwede CK, Reinecke JD, Mason TM, Silva C. Developing a referral system for fertility preservation among patients with newly diagnosed cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2011; 9: 1219-1225.
- Selevan SG, Kimmel CA, Mendola P. Identifying critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect*. 2000; 108: 451-455.
- Ménézo YJ, Hazout A, Panteix G, Panteix G, Robert F, Rollet J et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reproductive BioMedicine Online*. 2007; 14: 418-421.
- Vagnini L, Baruffi R, Mauri A, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A et al. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reproductive BioMedicine Online*. 2007; 15: 514-519.
- Elshal MF, El-Sayed IH, Elsaied MA, El-Masry SA, Kumosani TA. Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. *Clinical Biochemistry*. 2009; 42: 589-594.
- Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez EI, Núñez R, Fernández JL, Caballero P, López-Fernández C et al. A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertility and Sterility*. 2009; 92: 1915-1919.
- Meseguer M, Molina N, García-Velasco JA, Remohí J, Pellicer A, Garrido N. Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year follow-up study. *Fertility and Sterility*. 2006; 85: 640-645.
- Pelliccione F, Verratti V, D'Angeli A, Micillo A, Doria C, Pezzella A et al. Physical exercise at high altitude is associated with a testicular dysfunction leading to reduced sperm concentration but healthy sperm quality. *Fertility and Sterility*. 2011; 96: 28-33.
- Avendano C, Mata A, Sánchez-Sarmiento CA, Doncel GF. Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility*. 2012; 97: 39-45. e2.
- Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Steve J, Alfonso M, Carlos F et al. DNA fragmentation dynamics allows the assessment of cryptic sperm damage in human: evaluation of exposure to ionizing radiation, hyperthermia, acidic pH and nitric oxide. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2012; 734: 41-49.
- Dupont C, Faure C, Sermonnade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian Journal of Andrology*. 2013; 15: 622-625.
- Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernández JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility*. 2011; 95: 124-128.
- Henkel R, Maass G, Schuppe HC, Jung A, Schubert J, Schill WB. Molecular aspects of declining sperm motility in older men. *Fertility and Sterility*. 2005; 84: 1430-1437.
- Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Human Reproduction*. 2005; 20: 2776-2783.
- O'Connell M, McClure N, Lewis S. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. *Human Reproduction*. 2002; 17: 1565-1570.
- May-Panloup P, Chrétien MF, Savagner F, Vasseur C, Jean M, Malthièry Y et al. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Human Reproduction*. 2003; 18: 550-556.
- Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103: 9601-9606.
- Ashwood-Smith M, Edwards R. Genetics and human conception DNA repair by oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 1996; 2: 46-51.
- Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aoja-nepong T et al. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *Plos One*. 2010; 5: e10287.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2004; 81: 1289-1295.
- Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertility and Sterility*. 2005; 84: 356-364.
- Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, François-Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility*. 2007; 87: 93-100.
- Lin MH, Kuo-Kuang LR, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but

- might be related to spontaneous abortion rates. *Fertility and Sterility*. 2008; 90: 352-359.
31. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: World Health Organization. 2010.
 32. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertility and Sterility*. 2013; 99: 673-677.
 33. Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jørgensen N, Andersson AM, Krarup T et al. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Human Reproduction*. 2000; 15: 366-372.
 34. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Álvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm dna fragmentation. *Journal of Andrology*. 2003; 24: 59-66.
 35. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of Andrology*. 2009; 30: 219-229.
 36. Liu J, Squibb KS, Akkerman M, Nordberg GF, Lipsky M, Fowler BA. Cytotoxicity, zinc protection, and stress protein induction in rat proximal tubule cells exposed to cadmium chloride in primary cell culture. *Renal Failure*. 1996; 18: 867-882.
 37. Chandra R, Au B. Single nutrient deficiency and cell-mediated immune responses. I. Zinc. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1980; 33: 736-738.
 38. Hamden K, Allouche N, Damak M, Carreau S, Elfeki A. Potential protective effect of hydroxytyrosol against glucose-induced toxicity in spermatozoa *in vitro*. *Asia Life Sciences*. 2010; 19: 333-344.
 39. Oliveira JBA, Massaro FC, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Silva LFI et al. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. *Fertility and Sterility*. 2010; 94: 1937-1940.
 40. Mauri AL, Oliveira JBA, Baruffi RLR, Petersen CG, Vagnini LD, Massaro FC et al. Significance of extruded nuclear chromatin (regional nuclear shape malformation) in human spermatozoa: implications for ICSI. *International Journal of Andrology*. 2011; 34: 594-599.
 41. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology*. 2006; 27: 53-59.
 42. De Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and Sterility*. 2006; 86: 597-600.
 43. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A et al. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Human Reproduction*. 2005; 20: 185-190.
 44. Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Molecular Human Reproduction*. 1998; 4: 757-762.
 45. Agarwal A, Said TM. Carnitines and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2004; 8: 376-384.
 46. Ou YC, Lan KC, Huang FJ, Kung FT, Lan TH, Chang SY. Comparison of *in vitro* fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in extremely low oocyte retrieval cycles. *Fertility and Sterility*. 2010; 93: 96-100.
 47. Schröder AK, Diedrich K, Ludwig M. Fertilization rate and preimplantation development after intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive BioMedicine Online*. 2001; 3: 241-249.
 48. French DB, Sabanegh ES, Goldfarb J, Desai N. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertility and Sterility*. 2010; 93: 1097-1103.
 49. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction*. 2002; 17: 3122-3128.
 50. Sun JG, Jurisicova DA, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. 1998; 69: 528-532.
 51. Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 2010; 16: 3-13.
 52. Agarwal A, Nallela KP, Allamaneni SSR, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive BioMedicine Online*. 2004; 8: 616-627.