



Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina

Portella-Ruiz JR,^{1,2} Gonzales GF^{2,3}

Resumen

La integridad del ADN espermático es una importante característica para tener una descendencia saludable. Esta revisión informa el origen de la fragmentación del ADN espermático, las metodologías disponibles para su evaluación y su repercusión en la reproducción. La estrategia de búsqueda incluyó, pero no fue limitada a las palabras claves como: *sperm DNA fragmentation, sperm DNA damage, sperm oxidative stress, male infertility, assisted reproductive technologies*, en *Pubmed* y *ScienceDirect*. La principal causa de fragmentación del ADN espermático radica en la inadecuada compactación de la cromatina nuclear que, a su vez, lo hace más susceptible al daño por estrés oxidativo. Si bien existe correlación entre las diversas técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático, puede observarse gran variabilidad en los puntos de corte para distinguir o clasificar a los hombres fértiles de los infértiles. El mayor efecto de la fragmentación del ADN espermático se observa en la tasa de abortos, donde existe una asociación positiva. Por tanto, el análisis de la fragmentación del ADN espermático debe aplicarse como parte integral de la evaluación de la infertilidad masculina.

PALABRAS CLAVES: fragmentación del ADN, infertilidad masculina, espermatozoide, técnicas de reproducción asistida, estrés oxidativo.

Ginecol Obstet Mex. 2016 Jul;84(7):462-473.

Sperm DNA fragmentation: origin, evaluation and impact in male fertility

Portella-Ruiz JR,^{1,2} Gonzales GF^{2,3}

Abstract

Sperm DNA integrity is important to have a healthy child. The current review has the aim to describe the causes of sperm DNA fragmentation, to explain the different methodologies used to analyze sperm DNA fragmentation and to discuss the clinical relevance of this diagnostic test. Original articles were selected by using a non-systematic narrative review. Articles were selected but not limited to using words such

¹ PRANOR, Grupo de Reproducción Asistida. Lima, Perú.

² Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

³ Instituto de Investigaciones de la Altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú

Recibido: abril 2015

Aceptado: mayo 2016

Correspondencia

Biol. Jimmy Portella
Los Olivos 364, Lima 27, Perú.
jimmy.portella@pranor.com

Este artículo debe citarse como

Portella-Ruiz JR, Gonzales GF. Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. Ginecol Obstet Mex. 2016 jul;84(7):462-473.



as sperm DNA fragmentation, sperm DNA damage, sperm oxidative stress, male infertility, assisted reproductive technologies. The data bases used were Pubmed and ScienceDirect. The main cause of sperm DNA fragmentation is the oxidative stresses which together to the inadequate sperm chromatin compaction during the spermiogenesis produce a high rate of sperm DNA fragmentation. There is a correlation among several sperm DNA fragmentation test. Nevertheless, there are different cut off values to classify a man as a normal. The sperm DNA fragmentation has a major effect on the miscarriage rate, with a positive correlation. Finally, sperm DNA fragmentation analysis must be used as an additional test in the clinical evaluation for male infertility.

KEY WORDS: DNA fragmentation; Male infertility; Sperm; Assisted reproductive technologies; Oxidative stress

¹ PRANOR, Grupo de Reproducción Asistida. Lima, Perú.

² Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

³ Instituto de Investigaciones de la Altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú

Correspondence

Biol. Jimmy Portella

Los Olivos 364, Lima 27, Perú.

jimmy.portella@pranor.com

ANTECEDENTES

En la evaluación inicial de la pareja infértil es necesario el análisis del semen, pues el factor masculino representa la mitad de los casos de infertilidad.¹ En el análisis seminal se observan, principalmente, características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas del eyaculado, según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud.² El número total de espermatozoides en el semen es un reflejo de su producción en los testículos y la permeabilidad de los conductos post-testiculares. Entre las características microscópicas se analizan: la concentración, movilidad y morfología de los espermatozoides; sin embargo, ninguno de esos parámetros, de modo independiente, representa un poderoso predictor de infertilidad.³

En la actualidad se han intensificado los esfuerzos por encontrar el marcador ideal para diferenciar a los hombres infértiles de los fértiles y pronosticar la posibilidad de lograr el embarazo, ya sea espontáneo o con técnicas de reproducción asistida. Para ello deben identificarse los componentes que aporta el espermatozoide al ovocito durante la fecun-

dación: 1) genoma haploide; 2) centriolo (conduce la formación del huso mitótico para la primera y sucesivas divisiones celulares);⁴ 3) factor activador del ovocito (induce la respuesta del calcio; se trata de una fosfolipasa C-zeta específica del espermatozoide);⁵ y 4) ácidos ribonucleicos mensajeros (proteínas implicadas en el desarrollo embrionario temprano).⁶

La evidencia clínica en reproducción asistida sugiere que la falla en la fecundación o el desarrollo embrionario puede originarse por la alteración de los componentes espermáticos mencionados.⁷ Sin embargo, estos elementos no son evaluados en el análisis convencional del semen.² Evenson y su grupo⁸ propusieron, inicialmente, la evaluación de la integridad del ADN espermático como un marcador de infertilidad masculina. Los espermatozoides dañados o con fragmentación del ADN son capaces de fecundar⁹ y ese daño puede persistir aún después de la fecundación.¹⁰ Durante el proceso de fecundación *in vivo*, el aparato reproductor femenino tiene mecanismos de selección contra espermatozoides dañados en su ADN;¹¹ esta característica no existe en los procedimientos de fecundación *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermato-

zoides (ICSI) en los tratamientos de fertilidad.¹¹ En modelos animales se ha demostrado que el desarrollo embrionario se afecta cuando existe daño en el ADN de origen paterno.^{12,13} Además, la supervivencia posnatal es reducida o puede conducir a la expresión de enfermedades tardías en la descendencia.¹⁴⁻¹⁶

Esta revisión informa el origen de la fragmentación del ADN espermático, las metodologías disponibles para su evaluación y su repercusión en la reproducción.

MATERIAL Y MÉTODO

Revisión no sistemática que consideró los artículos originales publicados en revistas con revisión por pares, basados en los factores que causan la fragmentación del ADN espermático y su repercusión en la fertilidad. La estrategia de búsqueda incluyó, pero no fue limitada a las palabras claves como: *sperm DNA fragmentation, sperm DNA damage, sperm oxidative stress, male infertility, assisted reproductive technologies*. Se consultaron las bases de datos de *Pubmed* y *ScienceDirect*. Las publicaciones más relevantes fueron discutidas, evaluadas y seleccionadas.

Origen de la fragmentación del ADN espermático

La célula germinal masculina, como cualquier célula somática, contiene histonas que son reemplazadas por proteínas de transición y, finalmente, por protaminas durante la espermiogénesis.¹⁷ El espermatozoide maduro contiene, en su composición nuclear, protaminas con abundante cantidad de residuos de arginina que permiten el "ultraempaquetamiento" del ADN, para reducir el acceso de moléculas pequeñas que puedan dañarlo.¹⁸ Este proceso de intercambio de proteínas depende de la topoisomerasa-II-beta,¹⁹ una enzima implicada en la ruptura de la cadena

de ADN en la espermátide elongada, que a su vez es regulada por la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa 1 y 2.²⁰ Las alteraciones en el metabolismo de la enzima poli-ADP-ribosa, por causas genéticas o farmacológicas, conducen a una deficiente estructuración de la condensación nuclear y sobreproducción de histonas,²¹ que provocan la infertilidad masculina.²² Por lo tanto, una de las manifestaciones del origen de la fragmentación de ADN en espermatozoides eyaculados incluye lesiones de la cadena simple o doble del ADN, debido al incompleto empaquetamiento nuclear.²³ Como consecuencia, esta alteración puede generar mayor susceptibilidad del ADN espermático a sufrir daño por otros mecanismos, como el estrés oxidativo.

Se ha propuesto que el principal origen de la fragmentación del ADN espermático se debe al estrés oxidativo.²⁴ Este evento molecular ocurre cuando existe un desequilibrio entre la formación de especies reactivas de oxígeno y la defensa antioxidante.²⁵ Diversas investigaciones han demostrado la relación entre menor capacidad antioxidante y grados elevados de estrés oxidativo en muestras de semen.^{26,27} Además, otros estudios señalan esta relación con daño en el ADN espermático.^{28,29}

El 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina es un producto de la oxidación del ADN (utilizado como biomarcador) formado por el radical hidroxilo (OH•).^{23,24} Las concentraciones elevadas de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina se han asociado con incompleta remodelación de la cromatina espermática y, a su vez, con fragmentación del ADN espermático.^{23,24} Un estudio en ratones demostró que el daño oxidativo del ADN ocurre, principalmente, en regiones periféricas y basales del núcleo del espermatozoide, con abundante cantidad de histonas y de dominios adheridos a la matriz nuclear.³⁰ Estas regiones son importantes porque contienen genes impli-



cados en el control de la replicación del ADN posfecundación y en el proceso del desarrollo embrionario.³¹

Las mitocondrias se asocian con mayor producción de especies reactivas de oxígeno, debido a la relación inversa entre la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina y el potencial de membrana mitocondrial.²³ Otro posible origen de especies reactivas de oxígeno proviene de los leucocitos en muestras de semen.³² Algunas enfermedades metabólicas, como la diabetes, también se han asociado con estrés oxidativo, daño del ADN y apoptosis,³³ además de algunos factores ambientales, como el humo del cigarro.³⁴

Otro mecanismo sugerido como causa de fragmentación del ADN espermático es la apoptosis y la activación de endonucleasas.³⁵ Este hecho se refuerza por marcadores apoptóticos asociados con la fragmentación del ADN espermático como: externalización de fosfatidilserina,^{36,37} activación de caspasas,^{38,39} citocromo C³⁹ y especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial.²³ Sin embargo, en el espermatozoide el ADN nuclear ultracompactado se mantiene completamente aislado de la pieza intermedia, que contiene las mitocondrias y el citoplasma remanente. Esta separación física impide la translocación nuclear de nucleasas activadas, principalmente la DNAsa activada por caspasas, el factor inductor de apoptosis o la endonucleasa G, que se originan en la pieza intermedia durante el proceso de inducción de apoptosis.⁴⁰

A diferencia de la apoptosis en las células somáticas, el espermatozoide no entrará en apoptosis mientras se mantiene activa la vía del fosfoinositol-3-cinasa (PI3K).⁴⁰ El PI3K estimula la producción del segundo mensajero: fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que a su vez conduce a la activación de la proteína Akt (proteína cinasa B). Un estudio demostró que la inactivación de esta vía, mediante un

inhibidor de PI3K, wortmanina, disminuye la movilidad espermática;⁴⁰⁻⁴² también se observó un cambio en la fosforilación de la proteína BAD, que puede asociarse con alguna función proapoptótica.⁴⁰ Por lo tanto, la inducción de la apoptosis espermática resulta de la inhibición de la vía PI3K-AKT, que provoca una serie de eventos caracterizados por: pérdida de la movilidad espermática, producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales, activación de caspasas en el citosol, externalización de fosfatidilserina, vacuolización del citoplasma y daño oxidativo del ADN.⁴⁰

Técnicas de evaluación del ADN espermático

El Cuadro 1 señala los diferentes métodos para evaluar la fragmentación del ADN espermático. La aplicación y validación de estas pruebas se realizaron, principalmente, con la finalidad de distinguir a los hombres fértiles de los infértiles, y evaluar su relación con el desarrollo embrionario y el resultado reproductivo en las técnicas de reproducción asistida.

Para evaluar la fragmentación del ADN espermático se han desarrollado métodos directos e indirectos. Los métodos directos incluyen la técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)³⁵ y el ensayo Cometa con pH neutro;⁴³ y los indirectos comprenden: prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD),⁴⁴ el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA),⁸ ensayo de naranja de acridina (AO)⁴⁵ y ensayo Cometa con pH alcalino.^{43,46} Los métodos indirectos requieren de un paso previo de desnaturalización, a pH ácido o alcalino, para detectar la lesión del ADN. De esta forma, los métodos directos determinan el "daño real", mientras que los indirectos el "daño potencial" del ADN. Aunque estas técnicas pueden mostrar correlación entre sí,⁴⁷ se han establecido diferentes puntos de corte

Cuadro 1. Descripción de las técnicas de evaluación de fragmentación del ADN espermático.

| Método | TUNEL | COMETA | SCD | SCSA | AO |
|------------------------|--|---|--|--|--|
| Base del ensayo | Agrega nucleótidos marcados al extremo libre del ADN | Electroforesis de espermatozoides individuales | Formación de un halo de ADN de espermatozoides sumergidos en agarosa | Tinción con AO y análisis por citometría de flujo | Tinción con AO y conteo manual de células rojas y verdes |
| Principio del análisis | Rotura de la hebra simple y doble de ADN | Rotura de la hebra simple y doble o sólo doble de ADN | Susceptibilidad del ADN a la desnaturalización ácida | Susceptibilidad del ADN a la desnaturalización ácida | Susceptibilidad del ADN a la desnaturalización ácida |
| Parámetro evaluado | % de células con ADN marcado | % de espermatozoides con cola (fragmentos de ADN) | % de espermatozoides con halo pequeño o ausente | DFI-relación de espermatozoides rojos a espermatozoides rojos y verdes | % de células con fluorescencia roja |
| Método análisis | MF, MCC y CF | MF | MF y MCC | CF | MF |
| Costo de materiales | Medio (kit diagnóstico) | Bajo | Bajo | Bajo | Bajo |
| Costo del equipamiento | Bajo (MCC), medio (MF), alto (CF) | Medio (MF y cámara electroforética) | Bajo (MCC), medio (MF) | Alto (CF) | Medio (MF) |

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*; SCD: dispersión de la cromatina espermática; SCSA: ensayo de la estructura de la cromatina espermática; AO: tinción naranja de acridina; DFI: índice de fragmentación del ADN; MF: microscopio de fluorescencia; MCC: microscopio de campo claro; CF: citometría de flujo.

para distinguir a los hombres fértiles de los infértiles,⁴⁸ pues determinan distintos aspectos del daño en el ADN espermático.^{49,50}

Técnica TUNEL

La técnica TUNEL requiere de la enzima transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT) para marcar el extremo libre 3' del ADN.³⁵ Esta técnica es capaz de detectar roturas de la cadena simple y doble del ADN, y puede analizarse por microscopía de fluorescencia (Figura 1a) o citometría de flujo.⁵¹ Su sensibilidad aumenta con el uso de ditiotreitól (DTT), como un paso adicional antes de la incubación con la enzima.⁵² Este agente reductor relaja la cromatina y, por lo tanto, facilita el acceso de la transferasa terminal a las cadenas rotas del ADN ubicadas en el interior del núcleo espermático. Sin embargo, estudios realizados con diversos protocolos establecen el punto de corte < 20% para distinguir a los hombres fértiles

de los infértiles.^{48,53,54} Recientemente, un estudio determinó que la medición de la fragmentación del ADN espermático por TUNEL se asocia significativamente con el resultado de las técnicas de reproducción asistida.⁵⁵ Otro metanálisis demostró mayor asociación entre la fragmentación del ADN espermático y la tasa de aborto (RR = 3.94 [2.45, 6.32], $P < 0.00001$) cuando se utiliza la técnica TUNEL.⁵⁶

Ensayo Cometa

Es un ensayo que utiliza electroforesis en gel de células individuales; en este caso, cuantifica las cadenas rotas de ADN de cada espermatozoide.⁴³ En el campo electroforético las hebras rotas de ADN se separan del núcleo y migran diferencialmente hacia el ánodo, según la masa del fragmento, de aquí que se conoce como "cola de cometa" (Figura 1d). Con esta técnica pueden detectarse las roturas de la cadena doble

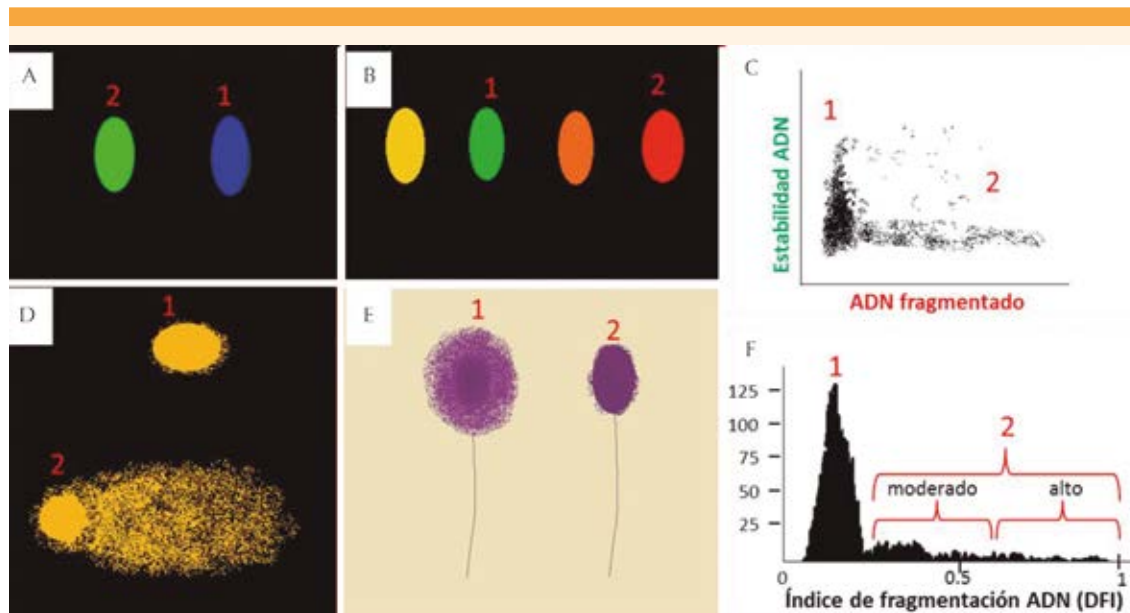


Figura 1. Observación microscópica de los espermatozoides sin (1) y con fragmentación del ADN (2): técnica de TUNEL contrastado con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (a), Naranja de acridina (b), ensayo COMETA (d) y dispersión de la cromatina espermática (e). Evaluación por citometría de flujo y resultado del análisis de un programa de cómputo en el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (c y f).

del ADN cuando se realiza en condiciones neutras (ensayo Cometa neutro); o las roturas de la cadena simple y sitios álcali-lábiles en condiciones alcalinas (ensayo Cometa alcalino).⁵⁷ Cada ensayo, en condiciones neutras o alcalinas, puede relacionarse con el tipo de daño y posterior efecto en la paternidad. Los fragmentos de la cadena simple pueden aparecer en donantes u hombres infértiles y distribuirse a lo largo del genoma, lo que modifica las bases en la descendencia; en cambio, los fragmentos de la doble cadena del ADN se asocian con pérdida recurrente del embarazo en parejas sin ningún factor femenino.^{58,59} Sin embargo, la comparación de diversas técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático y sus aplicaciones para distinguir a los hombres fértiles de los infértiles demuestra que el ensayo Cometa neutro es incapaz de realizar esta diferenciación.⁴⁸ Una posible explicación es que el ensayo no detecta todas las

roturas de la cadena doble del ADN, debido a que permanecen unidas a la matriz nuclear del espermatozoide. La adición de dodecil sulfato de sodio (SDS) y ditioneitol (DTT) puede revelar los fragmentos de la doble cadena del ADN que estuvieron unidos a la matriz nuclear.⁶⁰ Después de la modificación del protocolo original del ensayo Cometa se desarrolló el ensayo Cometa de 2 colas, que permitió evaluar simultáneamente los fragmentos de la cadena simple y doble de ADN en el mismo espermatozoide.⁶¹

A diferencia de la técnica TUNEL, que muestra mayor uniformidad en el punto de corte para diagnosticar infertilidad masculina,^{48,53,54} el ensayo Cometa alcalino tiene gran variabilidad.^{48,62} A pesar de ello, la fragmentación del ADN espermático, evaluada por el ensayo Cometa alcalino, se relaciona inversamente con las tasas de embarazo por técnicas de re-

producción asistida^{55,63} y de recién nacido vivo por fertilización *in vitro*.⁶⁴

Ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA)

Este ensayo evalúa la susceptibilidad del ADN espermático a su desnaturalización *in situ* después de utilizar algún tratamiento ácido.^{8,65} Se determina con el colorante AO, que emite fluorescencia verde cuando se intercala en el ADN de cadena doble y fluorescencia roja (ADN fragmentado) en el ADN de cadena sencilla. La lectura se realiza con citometría de flujo y pueden contarse entre 5,000 y 10,000 espermatozoides en pocos segundos. Mediante el programa específico de cómputo para el ensayo de la estructura de la cromatina espermática es posible categorizar la relación de espermatozoides verdes y rojos (Figura 1c y 1f), de donde se obtiene el índice de fragmentación del ADN (DFI), representado por el porcentaje de espermatozoides rojos.⁶⁶

Desde su creación, hace más de 30 años, el ensayo se ha estandarizado y validado por diversos estudios, tal es así que el punto de corte del índice de fragmentación del ADN se definió entre 27 y 30% de posibilidad de lograr un embarazo.⁶⁷⁻⁶⁹ Cuando se aplican técnicas de reproducción asistida con índice de fragmentación del ADN > 30%, se sugiere la aplicación de inyección intracitoplasmática (ICSI) como método de fecundación.⁶⁸ Un estudio reciente demostró que el porcentaje de fragmentación del ADN espermático, evaluado por el ensayo de la estructura de la cromatina espermática, es incapaz de predecir el éxito de las técnicas de reproducción asistida, comparado con la técnica de TUNEL y el ensayo Cometa.⁵⁵ La desventaja del ensayo de la estructura de la cromatina espermática y su aplicación en los laboratorios de andrología radica en el alto costo de la citometría de flujo.

Prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD)

Esta técnica es actualmente comercializada en forma de equipo (Halosperm®). La técnica se basa en el principio que el ADN fragmentado no produce el halo característico de sus formas helicoidales, observadas en los espermatozoides con ADN no fragmentado (Figura 1e). Para ello se realizan tres pasos principales: 1) las células espermáticas son embebidas en un gel inerte de agarosa y se colocan en un portaobjetos; 2) se incuban con un tratamiento ácido (HCl) para permitir la desnaturalización del ADN; y 3) se aplica una solución de lisis para eliminar las proteínas nucleares. La observación de los espermatozoides en la matriz del gel de agarosa puede realizarse por microscopía de fluorescencia o de campo claro.⁴⁴ Además, la prueba de dispersión de la cromatina espermática permite identificar a los espermatozoides degradados, que se caracterizan por mayor alteración de la cadena simple y doble del ADN, y de las proteínas nucleares, un patrón observado, principalmente, en pacientes con varicocele.⁷⁰ La validación de esta técnica se realizó de manera indirecta, comparándola con otras que también miden la fragmentación del ADN espermático, y demostró buena correlación con la técnica de TUNEL y el ensayo de la estructura de la cromatina espermática.^{47,48}

Ensayo de naranja de acridina (AO)

El ensayo de naranja de acridina se desarrolló como una alternativa más simple de evaluar la fragmentación del ADN espermático por microscopía de fluorescencia en lugar de citometría de flujo.⁴⁵ Aunque su principio es similar al ensayo de la estructura de la cromatina espermática, existe demasiada subjetividad del analizador en la capacidad de diferenciar la fluorescencia roja y verde, debido a la gama de colores intermedios que aparecen en la prueba (Figura 1b). Un estudio comparativo con



otras técnicas, como TUNEL y el ensayo de la estructura de la cromatina espermática, cuestiona el valor clínico del ensayo de la naranja de acridina.⁴⁷

Repercusión en la fertilidad

los hombres infértiles poseen espermatozoides con grados elevados de ADN fragmentado; sin embargo, esta característica no se ha observado en el análisis convencional del semen² y algunos casos pueden clasificarse, erróneamente, como infertilidad inexplicable.^{50,62} Al evaluar el índice de fragmentación del ADN mediante el ensayo de la estructura de la cromatina espermática en la concepción natural, se determinó que el valor mayor de 30% predice una probabilidad de embarazo cercana a cero.⁶⁷ Resultados similares se obtuvieron en pacientes sometidas a 387 ciclos de inseminación intrauterina (IIU), cuya tasa de embarazo y parto fue de 23.7 y 19% con índice de fragmentación de ADN $\leq 30\%$, y de 3 y 1.5% con índice de fragmentación mayor de 30%, respectivamente.⁶⁸

En tratamientos de reproducción asistida, la tasa de embarazo disminuye cuando el índice de fragmentación del ADN es mayor de 30% en pacientes sometidas a ciclos de fertilización in vitro^{68,69} versus inyección intracitoplasmática.⁶⁸ Del mismo modo, los grados de fragmentación del ADN espermático evaluados por ensayo Cometa reportan menor tasa de recién nacidos vivos por fertilización in vitro versus inyección intracitoplasmática.⁶⁴ Otro estudio reportó similar tasa de embarazo en pacientes que recibieron inyección intracitoplasmática con espermatozoides morfológicamente normales de hombres con alto ($> 50\%$) y bajo índice de fragmentación del ADN ($< 15\%$).⁷¹ Por lo tanto, estos trabajos demuestran que la inyección intracitoplasmática es eficaz para lograr un embarazo, incluso provenientes de muestras seminales con alto grado de fragmentación de ADN. No obstante,

la influencia del daño del ADN espermático en la calidad y el desarrollo embrionario puede ser más significativa en pacientes que reciben inyección intracitoplasmática versus fertilización in vitro.¹¹

Un modelo ideal para estudiar el efecto de la fragmentación del ADN espermático, mediante técnicas de reproducción asistida, es la evaluación de ovocitos donados.⁷² Las donantes de ovocitos son mujeres jóvenes y sin problemas reproductivos aparentes. Un estudio con ovocitos donados, sometidos a ciclos de inyección intracitoplasmática (ICSI), demostró que el grado elevado de fragmentación del ADN espermático influye negativamente en el resultado reproductivo.⁷³ Además, la separación espermática mediante la técnica *swim-up* reduce la fragmentación del ADN, aunque no garantiza obtener un embarazo en ciclos de ICSI.⁷³ Por el contrario, dos estudios no encontraron relación entre los grados de fragmentación del ADN espermático y resultados adversos en pacientes sometidas a fertilización in vitro versus inyección intracitoplasmática con ovocitos donados.^{74,75}

La variabilidad del efecto de fragmentación del ADN espermático para lograr un embarazo puede relacionarse con la calidad y capacidad del sistema de reparación del ADN dentro del ovocito.^{10,76} Sin embargo, cuando el daño proviene de la cadena doble de ADN, es mucho más difícil su reparación.⁷⁷ Como consecuencia, uno de los principales efectos negativos en el desarrollo embrionario⁷⁷ se asocia con pérdida del embarazo en parejas sin ningún factor femenino.⁵⁸

Los grados elevados de fragmentación del ADN espermático se correlacionan positivamente con las tasas de aborto.^{56,78} La técnica de evaluación de fragmentación del ADN espermático que mostró mayor asociación con el aborto fue la técnica TUNEL.^{56,78} También se ha observado

que los espermatozoides cromosómicamente anormales son más propensos a la fragmentación del ADN que los normales.⁷⁹ Se ha propuesto que la incorrecta segregación cromosómica durante la maduración espermática conduce a un estado apoptótico concomitante con fragmentación del ADN, aunque no exhiban una conexión clara con marcadores tempranos de apoptosis.³⁶ Las anomalías cromosómicas de los espermatozoides de hombres infértiles pueden alterar los embriones resultantes.⁸⁰ Finalmente, la asociación entre fragmentación del ADN y aneuploidías cromosómicas espermáticas puede relacionarse con las anomalías cromosómicas detectadas en abortos espontáneos que provienen de ciclos de inyección intracitoplasmática de pacientes con infertilidad masculina.⁸¹

CONCLUSIONES

La evidencia científica señala que la fragmentación del ADN espermático tiene repercusión importante en la reproducción natural y asistida. Además, existe una fuerte asociación entre fragmentación del ADN espermático y pérdida temprana del embarazo. Por lo tanto, el análisis de la integridad del ADN espermático debe incluirse en el protocolo de evaluación de la fertilidad masculina.

REFERENCIAS

1. Farhi J, Ben-Haroush A. Distribution of causes of infertility in patients attending primary fertility clinics in Israel. *Isr Med Assoc J* 2011;13:51-4.
2. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010;pp:271.
3. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Eng J Med* 2001;345:1388-93.
4. Sathananthan AH, Tatham B, Dharmawardena V, Grills B, Lewis I, Trounson A. Inheritance of sperm centrioles and centrosomes in bovine embryos. *Arch Androl* 1997;38:37-48.
5. Nomikos M, Theodoridou M, Elgmati K, Parthimos D, Calver BL, Buntwal L, et al. Human PLCzeta exhibits superior fertilization potency over mouse PLCzeta in triggering the Ca(2+) oscillations required for mammalian oocyte activation. *Mol Hum Reprod* 2014;20:489-98.
6. Sandler E, Johnson GD, Mao S, Goodrich RJ, Diamond MP, Hauser R, et al. Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. *Nucleic Acids Res* 2013;41:4104-17.
7. Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendano C, et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril* 2009;92:835-48.
8. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980;210:1131-3.
9. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999;284:696-704.
10. Yamauchi Y, Riel JM, Ward MA. Paternal DNA damage resulting from various sperm treatments persists after fertilization and is similar before and after DNA replication. *J Androl* 2012;33:229-38.
11. Hourcade JD, Perez-Crespo M, Fernandez-Gonzalez R, Pintado B, Gutierrez-Adan A. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:9.
12. Gawecka JE, Marh J, Ortega M, Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS. Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. *PLoS One*. 2013;8:e56385.
13. Song SH, Lim JJ, Bang JK, Cha SK, Lee DR, Kim YS, et al. Evaluation of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) damage and effects on embryo development using a mouse cryptorchidism model. *Urology* 2013;82:743 e17-23.
14. Kumar D, Upadhyay D, Saliyan SR, Rao SB, Kalthur G, Kumar P, et al. The extent of paternal sperm DNA damage influences early post-natal survival of first generation mouse offspring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;166:164-7.
15. Adiga SK, Upadhyay D, Kalthur G, Bola Sadashiva SR, Kumar P. Transgenerational changes in somatic and germ line genetic integrity of first-generation offspring derived from the DNA damaged sperm. *Fertil Steril* 2010;93:2486-90.
16. Fernandez-Gonzalez R, Moreira PN, Perez-Crespo M, Sanchez-Martin M, Ramirez MA, Pericuesta E, et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008;78:761-72.
17. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010;139:287-301.
18. DeRouchey J, Hoover B, Rau DC. A comparison of DNA compaction by arginine and lysine peptides: a physical basis for arginine rich protamines. *Biochemistry* 2013;52:3000-9.
19. Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G. DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod* 2008;78:324-32.

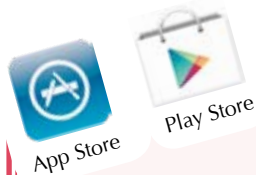


20. Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, Meistrich ML, Austin CA, Meyer RG. Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol Reprod* 2011;84:900-9.
21. Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, Bader JJ, Meyer RG. Alteration of poly(ADP-ribose) metabolism affects murine sperm nuclear architecture by impairing pericentric heterochromatin condensation. *Chromosoma* 2013;122:319-35.
22. Zhang X, San Gabriel M, Zini A. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl* 2006;27:414-20.
23. De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009;81:517-24.
24. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010;25:2415-26.
25. Kaur R, Kaur J, Mahajan J, Kumar R, Arora S. Oxidative stress--implications, source and its prevention. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014;21:1599-613.
26. Naher ZU, Ali M, Biswas SK, Mollah FH, Fatima P, Hossain MM, et al. Effect of oxidative stress in male infertility. *Mymensingh Med J* 2013;22:136-42.
27. Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari F, De Stefani S, et al. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reprod Biomed Online* 2012;25:300-6.
28. Khosravi F, Valojerdi MR, Amanlou M, Karimian L, Abolhassani F. Relationship of seminal reactive nitrogen and oxygen species and total antioxidant capacity with sperm DNA fragmentation in infertile couples with normal and abnormal sperm parameters. *Andrologia* 2012;46(1):17-23.
29. Aktan G, Dogru-Abbasoglu S, Kucukgergin C, Kadioglu A, Ozdemirler-Erata G, Kocak-Toker N. Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril* 2013;99:1211-5.
30. Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, Henry-Berger J, Cadet R, Saez F, et al. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic Biol Med* 2013;65:719-23.
31. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009;460:473-8.
32. Mupfiga C, Fisher D, Kruger T, Henkel R. The relationship between seminal leukocytes, oxidative status in the ejaculate, and apoptotic markers in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med* 2013;59:304-11.
33. Kilarikaje N, Al-Hussaini H, Al-Bader MM. Diabetes-induced DNA damage and apoptosis are associated with poly (ADP ribose) polymerase 1 inhibition in the rat testis. *Eur J Pharmacol* 2014;737:29-40.
34. La Maestra S, De Flora S, Micale RT. Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *Int J Hyg Environ Health* 2015;218:117-22.
35. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exper Cell Res* 1993;207:202-5.
36. Vendrell X, Ferrer M, Garcia-Mengual E, Munoz P, Trivino JC, Calatayud C, et al. Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reprod Biomed Online* 2014;28:492-502.
37. Almeida C, Sousa M, Barros A. Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2009;19:770-7.
38. Marchiani S, Tamburrino L, Olivito B, Betti L, Azzari C, Forti G, et al. Characterization and sorting of flow cytometric populations in human semen. *Andrology* 2014;2:394-401.
39. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Jr., Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;80:531-5.
40. Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* 2011;436:687-98.
41. Tan W, Thomas P. Activation of the PI3k/Akt pathway and modulation of phosphodiesterase activity via membrane progesterin receptor-alpha (mPRalpha) regulate progesterin-initiated sperm hypermotility in Atlantic croaker. *Biol Reprod* 2014;90:105.
42. Sagare-Patil V, Vernekar M, Galvankar M, Modi D. Progesterone utilizes the PI3K-AKT pathway in human spermatozoa to regulate motility and hyperactivation but not acrosome reaction. *Mol Cell Endocrinol* 2013;374:82-91.
43. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.
44. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005;84:833-42.
45. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984;42:87-91.
46. Kopjar N, Milas I, Garaj-Vrhovac V, Gamulin M. Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation

- of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. *Clin Exp Med* 2006;6:177-90.
47. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006;27:53-9.
 48. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013;1:715-22.
 49. Henkel R, Hoogendijk CF, Bouic PJ, Kruger TF. TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. *Andrologia* 2010;42:305-13.
 50. Feijo CM, Esteves SC. Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *Fertil Steril* 2014;101:58-63.e3.
 51. Muratori M, Forti G, Baldi E. Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling. *Cytometry A* 2008;73:785-7.
 52. Mitchell LA, De Iuliis GN, Aitken RJ. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int J Androl* 2011;34:2-13.
 53. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20:3446-51.
 54. Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 2010;76:1380-6.
 55. Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, et al. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 2014;29:904-17.
 56. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012;27:2908-17.
 57. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 1996;363:89-96.
 58. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Amengual MJ, Prada E, Cortes P, et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* 2012;7:e44679.
 59. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* 2012;27:652-8.
 60. Ribas-Maynou J, Gawecka JE, Benet J, Ward WS. Double-stranded DNA breaks hidden in the neutral Comet assay suggest a role of the sperm nuclear matrix in DNA integrity maintenance. *Mol Hum Reprod* 2014;20:330-40.
 61. Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernandez JL, Gosalvez J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2009;18:609-16.
 62. Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril* 2011;95:652-7.
 63. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod* 2010;25:1594-608.
 64. Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, et al. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 2013;26:68-78.
 65. Evenson DP, Higgins PJ, Grueneberg D, Ballachey BE. Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea. *Cytometry* 1985;6:238-53.
 66. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.
 67. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14:1039-49.
 68. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174-9.
 69. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 2006;21:1576-82.
 70. Gosalvez J, Rodriguez-Predreira M, Mosquera A, Lopez-Fernandez C, Esteves SC, Agarwal A, et al. Characterisation of a subpopulation of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the sperm chromatin dispersion test. *Andrologia* 2014;46:602-9.
 71. Dar S, Grover SA, Moskovtsev SI, Swanson S, Baratz A, Librach CL. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with a markedly high DNA fragmentation index (>50%). *Fertil Steril* 2013;100:75-80.
 72. Nunez-Calonge R, Caballero P, Lopez-Fernandez C, Guijarro JA, Fernandez JL, Johnston S, et al. An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reprod Sci* 2012;19:1163-8.



73. Gosalvez J, Caballero P, Lopez-Fernandez C, Ortega L, Guijarro JA, Fernandez JL, et al. Can DNA fragmentation of neat or swim-up spermatozoa be used to predict pregnancy following ICSI of fertile oocyte donors? *Asian J Androl* 2013;15:812-8.
74. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Garcia-Herrero S, Remohi J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2011;95:124-8.
75. Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, et al. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:704-10.
76. Grenier L, Robaire B, Hales BF. The activation of DNA damage detection and repair responses in cleavage-stage rat embryos by a damaged paternal genome. *Toxicol Sci* 2012;127:555-66.
77. Derijck A, van der Heijden G, Giele M, Philippens M, de Boer P. DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum Mol Genet* 2008;17:1922-37.
78. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2014;102:998-1005.e8.
79. Enciso M, Alfarawati S, Wells D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod* 2013;28:1707-15.
80. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Gordts S, Fredericks V, Crippa A. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online* 2009;18:536-42.
81. Kim JW, Lee WS, Yoon TK, Seok HH, Cho JH, Kim YS, et al. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment. *BMC Med Genet* 2010;11:153.



AVISO IMPORTANTE

Tal como fue anunciado durante un año, hoy ***Ginecología y Obstetricia de México*** es una revista solo digital (www.ginecologiayobstetricia.org.mx) con todas las ventajas que los medios electrónicos ofrecen.

Para consultar el texto completo de los artículos deberá registrarse por una sola vez con su correo electrónico, crear una contraseña, indicar su nombre, apellidos y especialidad.

Esta información es indispensable para saber qué consulta y cuáles son sus intereses, y poder en el futuro inmediato satisfacer sus necesidades de información.