



Alteración de los parámetros seminales y su asociación con la fragmentación del ADN espermático

Calull-Bagó A, González-Ortega C, Cancino-Villarreal P, Zúñiga-Sánchez P, Ruvalcaba-Ortega L, Gutiérrez-Gutiérrez AM

Resumen

ANTECEDENTES: el patrón de referencia para evaluar la infertilidad masculina es el análisis seminal, aunque es incapaz de detectar la fragmentación del ADN espermático relacionado con resultados reproductivos adversos.

OBJETIVO: analizar la relación entre los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático, y valorar la utilidad del seminograma como predictor de fragmentación.

MATERIALES Y MÉTODOS: estudio retrospectivo y observacional efectuado en pacientes del Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida con problemas de fertilidad. Análisis seminal e índice de fragmentación del ADN (DFI) mediante el test de dispersión de la cromatina espermática.

RESULTADOS: se estudiaron 206 pacientes: 43 (20.9%) con espermas normales y 163 (79.1%) con algún parámetro seminal alterado. En los individuos con espermas normales, 8 (18.6%) tuvieron fragmentación moderada y quienes resultaron con al menos un parámetro seminal alterado 49 (30.1%) reportaron fragmentación moderada y 22 (13.5%) fragmentación crítica. Se encontró una correlación negativa entre el índice de fragmentación del ADN y la movilidad, vitalidad y concentración ($p<0.0001$). No se encontró correlación alguna con el resto de los parámetros seminales. Las medias de fragmentación aumentaron conforme se incrementó el número de parámetros alterados. La razón de momios de fragmentación moderada y crítica en pacientes con oligozoospermia fue de 2.2 y 1.9; con astenozoospermia 8.0 y 26.2; con necrozoospermia 10.5 y 18.8; y con ≥ 3 alteraciones seminales 4.6 y 14.2, respectivamente.

CONCLUSIONES: en pacientes con astenozoospermia, necrozoospermia u oligozoospermia o con ≥ 3 parámetros seminales alterados se recomienda realizar el estudio de fragmentación del ADN.

PALABRAS CLAVE: fragmentación del ADN, infertilidad masculina, parámetros seminales.

Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida, León, Guanajuato, México.

Recibido: marzo 2017

Aceptado: abril 2017

Correspondencia

Anna Calull Bagó
a.calull@gmail.com

Este artículo debe citarse como

Calull-Bagó A, González-Ortega C, Cancino-Villarreal P, Zúñiga-Sánchez P, Ruvalcaba-Ortega L, Gutiérrez-Gutiérrez AM. Alteración de los parámetros seminales y su asociación con la fragmentación del ADN espermático. Ginecol Obstet Mex. 2017 julio;85(7):409-420.

Ginecol Obstet Mex. 2017 Jul;85(7):409-420.

Modification of seminal parameters and their association with sperm DNA fragmentation

Calull-Bagó A, González-Ortega C, Cancino-Villarreal P, Zúñiga-Sánchez P, Ruvalcaba-Ortega L, Gutiérrez-Gutiérrez AM

Abstract

BACKGROUND: the reference pattern to evaluate male infertility is a semen analysis; although it is unable to detect sperm DNA fragmentation related to adverse reproductive outcomes.

OBJECTIVE: to analyze the relationship between seminal parameters and sperm DNA fragmentation as well as assess the usefulness of semen analysis as predictor of fragmentation.

MATERIALS AND METHODS: retrospective, observational study performed in patients of the *Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida* with infertility problems. Semen analysis and sperm DNA fragmentation index (DFI) using the sperm chromatin dispersion test.

RESULTS: 206 patients were studied: 43 (20.9%) with normal sperm and 163 (79.1%) with an impaired seminal parameter. Of the individuals with normal sperm, 8 (18.6%) had moderate fragmentation and those who had at least one seminal parameter impaired 49 (30.1%) reported moderate fragmentation and 22 (13.5%) critical fragmentation. We found a negative correlation between the DNA fragmentation index and the motility, vitality and concentration ($p<0.0001$). We found no correlation whatsoever with the remaining seminal parameters. The fragmentation measurements increased as the number of impaired parameters increased. The odds ratio of moderate and critical fragmentation in patients with oligozoospermia was 2.2 and 1.9; with asthenozoospermia 8.0 and 26.2; con necrozoospermia 10.5 and 18.8; and with ≥ 3 seminal impairments 4.6 and 14.2, respectively.

CONCLUSIONS: in patients with asthenozoospermia, necrozoospermia or oligozoospermia or with ≥ 3 impaired seminal parameters, we recommend performing a DNA fragmentation test.

KEY WORDS: DNA fragmentation, male infertility, seminal parameters

Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida, León, Guanajuato, México.

Correspondence

Anna Calull Bagó
a.calull@gmail.com

ANTECEDENTES

La opción más utilizada para evaluar la infertilidad masculina es el análisis seminal, que aporta

información de la calidad de la espermatogénesis. En la actualidad se dispone de un método internacional para evaluar los parámetros seminales, descrito en la quinta edición del *Manual*



de la OMS.¹ Los límites inferiores acordados en esa edición son: volumen seminal ≥ 1.5 mL, concentración espermática ≥ 15 millones/mL, movilidad progresiva $\geq 32\%$, vitalidad $\geq 58\%$, morfología espermática normal $\geq 4\%$ y menos de un millón de leucocitos por mL. La desviación de uno o más parámetros seminales (por ejemplo, un recuento espermático bajo, movilidad escasa o abundantes formas anormales) es indicativa de probable infertilidad en la pareja con factor masculino.²

Durante las últimas décadas, el análisis seminal convencional ha recibido muchas críticas e, incluso, algunos autores lo han catalogado como obsoleto, sobre todo después de la introducción de técnicas como la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). No obstante, la mayoría de expertos en el campo de la andrología coincide en que el análisis básico del semen es, y seguirá siendo, el estudio principal y decisivo en la evaluación de la infertilidad masculina.

Se estima que alrededor de 15% de los hombres con un perfil seminal normal contribuye a la infertilidad de la pareja.³⁻⁶ Esto podría atribuirse a la incapacidad del análisis seminal convencional de revelar la causa de la infertilidad masculina. Por esto es necesario efectuar análisis más especializados que permitan investigar a nivel molecular la integridad funcional del espermatozoide.

Hace poco se demostró que el daño en el ADN espermático se relaciona con resultados adversos en las técnicas de reproducción asistida. Diversos estudios asocian fragmentaciones elevadas del ADN espermático con bajas tasas de fertilización,^{7,8,9} de desarrollo embrionario,^{10,11} de implantación,^{4,12,13,14} bajas tasas de embarazo^{6,8,13} y elevadas tasas de abortos y anomalías congénitas.^{4,6,12,15} Existen varias pruebas que permiten analizar la cromatina espermática y, aunque la metodología para cuantificar el daño

en el ADN espermático difiere entre ellas, los estudios comparativos han demostrado resultados de fragmentación parecidos con las pruebas más comúnmente utilizadas, como: TUNEL, COMETA, SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) y el test SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*).^{4,6,13,16} Sin embargo, los estudios efectuados hasta la fecha, que correlacionan los parámetros seminales con la fragmentación del ADN espermático, han mostrado resultados muy controvertidos.^{5,17-22} Esto se podría atribuir a la variabilidad en el método utilizado y a los diferentes valores de normalidad considerados en las distintas ediciones del Manual de la OMS.

En la mayor parte de los estudios publicados, la fragmentación del ADN espermático se ha relacionado con la calidad espermática, con base en los tres parámetros clásicos de calidad seminal: concentración, movilidad y morfología. Sin embargo, todo indica que no existe un estudio que haya tenido en cuenta el total de alteraciones seminales encontradas en el seminograma.

El principal objetivo de este estudio consiste en analizar la relación entre los parámetros obtenidos del análisis seminal (volumen, concentración, movilidad, leucocitos, vitalidad y morfología) y el resultado del análisis de la fragmentación del ADN. El objetivo secundario: valorar el uso del seminograma como predictor de fragmentación espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo y observacional efectuado en los hombres que acudieron, entre febrero de 2012 y abril de 2016, al Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida debido a problemas de fertilidad. A todos se les realizó el análisis seminal conforme a lo señalado en la quinta edición del *Manual de la OMS* y el test de dispersión de la cromatina espermática, con un equipo Halosperm® (Halotech DNA SL). Todas las muestras

se obtuvieron por masturbación después de 2 a 7 días de abstinencia sexual. Cada muestra se recolectó en un recipiente de plástico, estéril, de boca ancha y almacenada en una incubadora a 35°C durante máximo 30 minutos para permitir la licuefacción. Enseguida se procedió a realizar el seminograma y la valoración del grado de fragmentación del ADN espermático de la muestra seminal mediante el equipo de Halosperm® siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante. El Halosperm® es un test que permite valorar la fragmentación del ADN con base en la capacidad de desnaturalización y dispersión de la cromatina del espermatozoide. La cantidad de dispersión es inversamente proporcional al nivel de daño al ADN.

A grandes rasgos, las muestras se mezclaron con agarosa líquida y se fijaron en portaobjetos pretratados. Después se refrigeraron y se colocaron en una solución desnaturalizante y de lisis. A continuación, las muestras se tiñeron con el colorante Wright y se valoraron contando 500 espermatozoides por muestra, siguiendo los criterios de Fernández y colaboradores.²³ Cada uno de los 500 espermatozoides se clasificó en espermatozoide con ADN fragmentado (con halo pequeño, sin halo o degenerados) y no fragmentado (espermatozoide con halo mediano o grande). El índice de fragmentación del ADN (DFI) se calculó de la siguiente manera: número de espermatozoides fragmentados x 100 divididos entre 500. Por último, los resultados del Halosperm® se reportaron como fragmentación del ADN espermático normal en los casos de un índice de fragmentación menor de 15%, fragmentación moderada cuando el índice de fragmentación del ADN fue de 15 a 30% y fragmentación crítica cuando el índice de fragmentación fue mayor de 30%.²⁴⁻²⁷

El total de parámetros alterados en el análisis seminal se numeró a partir de 0, en el caso de los seminogramas sin ninguna alteración (nor-

mozoospermia) hasta 6 en el caso de tener todos los parámetros alterados (hipo-hiperespermia, oligozoospermia, astenozoospermia, leucocitospermia, necrozoospermia y teratozoospermia).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 17.0. Se analizaron las distribuciones de las variables y, en los casos en que fue necesario, se normalizaron mediante transformación logarítmica. Las diferencias entre grupos se analizaron con análisis de varianza ANOVA y el análisis *post-hoc* de Bonferroni. Las relaciones entre las variables se estudiaron con la correlación de Pearson y se obtuvieron las estimaciones del riesgo (OR) mediante la realización de tablas de contingencia. Las correlaciones y las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando fueron menores de 0.05.

RESULTADOS

Se incluyeron 206 hombres con edad media de 37.8 ± 7.5 años y media de 4.2 ± 1.2 días de abstinencia en el momento de depositar el eyaculado. Las muestras seminales tuvieron un volumen medio de 3.0 ± 1.6 mL, pH medio de 7.6 ± 0.2 , leucocitos de $1.3 \pm 0.4 \times 10^6/\text{mL}$, concentración espermática de $43.6 \pm 38.3 \times 10^6/\text{mL}$, movilidad progresiva del $48.8 \pm 23.3\%$, vitalidad de $69.7 \pm 19.5\%$ y media de $3.9 \pm 2.5\%$ de espermatozoides morfológicamente normales. La media de parámetros seminales alterados fue de 1.6 ± 1.3 con un mínimo de 0 alteraciones a un máximo de 5. No se observó ningún individuo con todos los parámetros seminales alterados. La media del índice de fragmentación del ADN del grupo de estudio fue de $17 \pm 15.7\%$; la fragmentación mínima fue 2.4% y la máxima de 94%. **Cuadro 1**

Los pacientes de este estudio acudieron a la clínica de reproducción por problemas de fertilidad con su pareja. De los 206 pacientes



Cuadro 1. Características descriptivas de los 206 pacientes estudiados

	Media (\pm DE)	Rango
Edad	37.8 \pm 7.5	26-63
Días de abstinencia	4.2 \pm 1.2	2-7
Volumen (mL)	3.0 \pm 1.6	0.1-8.5
pH	7.6 \pm 0.2	7.0-8.5
Leucocitos ($\times 10^6$ /mL)	1.3 \pm 0.4	0.5-9.5
Concentración ($\times 10^6$ /mL)	43.6 \pm 38.3	0.1-200
Progresivos (%)	48.8 \pm 23.3	0-91
Viables (%)	69.7 \pm 19.5	4-96
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	3.9 \pm 2.5	0-14
Total de alteraciones seminales	1.6 \pm 1.3	0-5.0
Índice de fragmentación del ADN (%)	17 \pm 15.7	2.4-94

incluidos y a quienes se realizó el seminograma y el test de fragmentación del ADN, 43 (20.9%) fueron normozoospérmicos y 163 (79.1%) tuvieron algún parámetro seminal alterado. Entre los pacientes normozoospérmicos, 35 (81.4%) resultaron con fragmentación del ADN espermático normal, 8 (18.6%) con fragmentación moderada y ninguno mostró fragmentación crítica. De los 163 pacientes con al menos un parámetro del seminograma alterado, 92 (56.4%) tuvieron una fragmentación del ADN normal, 49 (30.1%) fragmentación moderada y 22 (13.5%) resultaron con fragmentación crítica. En los seis pacientes con cinco parámetros alterados en el seminograma, tres mostraron una fragmentación moderada y tres una fragmentación crítica. No hubo ningún paciente con cinco alteraciones seminales con fragmentación normal.

Mediante el análisis de varianza ANOVA se observaron diferencias significativas entre los grupos de fragmentación normal, moderada y crítica en los días de abstinencia sexual ($p = 0.043$), en la concentración espermática ($p = 0.003$), en los porcentajes de espermatozoides

progresivos ($p < 0.0001$), espermatozoides viables ($p < 0.0001$), espermatozoides morfológicamente normales ($p = 0.013$) y en el total de alteraciones seminales ($p < 0.0001$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos de fragmentación en cuanto al volumen del eyaculado y la existencia de leucocitos ($p = 0.781$ y $p = 0.061$, respectivamente). **Cuadro 2**

Mediante el análisis *post-hoc* de Bonferroni solo la concentración de espermatozoides, los porcentajes de progresivos, de viables y del número total de alteraciones seminales, tuvieron medias significativamente diferentes cuando se compararon entre sí cada uno de los tres grupos de fragmentación.

Para evaluar la fuerza y dirección de cada una de las variables obtenidas del análisis seminal se realizó el análisis de correlación con el índice de fragmentación del ADN. Mediante este análisis se obtuvieron los siguientes resultados: correlación estrecha entre el índice de fragmentación del ADN y el porcentaje de espermatozoides progresivos ($r = -0.613$, $p < 0.0001$; **Figura 1A**), y en el porcentaje de espermatozoides viables ($r = -0.702$, $P < 0.0001$; **Figura 1B**), ambos relacionados negativamente con el índice de fragmentación del ADN. También se observó una correlación negativa e igualmente significativa con la concentración de espermatozoides, aunque en este caso la r de Pearson mostró una relación más débil entre estas dos variables ($r = -0.248$, $p < 0.0001$; **Figura 1C**). También se analizaron los resultados del índice de fragmentación del ADN cuando los pacientes no tuvieron ninguna alteración en el seminograma; es decir, pacientes con esperma normal, cuando tuvieron un parámetro alterado en el seminograma, cuando reportaron 2, 3, 4 y hasta 5 parámetros seminales alterados. Conforme los pacientes tuvieron mayor número de alteraciones en el seminograma, el índice de fragmentación del ADN se incrementó (**Figura 1D**). Concretamente,

Cuadro 2. Medias obtenidas de los diferentes parámetros seminales en función de los grupos de fragmentación del ADN espermático

	Media índice de fragmentación del ADN (\pm DE)			
	Normal (DFI<15%)	Moderada (DFI=15-30%)	Critica (DFI>30%)	p valor
Días de abstinencia	3.9 \pm 2.1	4.7 \pm 2.3	4.5 \pm 1.9	0.043
Volumen (mL)	2.9 \pm 1.5	3.1 \pm 1.5	3.0 \pm 2.1	0.781
Leucocitos ($\times 10^6$ /mL)	1.3 \pm 1.2	1.1 \pm 0.9	1.9 \pm 0.7	0.061
Concentración ($\times 10^6$ /mL)	50.5 \pm 40.1	32.3 \pm 31.0	32.6 \pm 31.7	0.003
Progresivos (%)	57.8 \pm 19.6	41.1 \pm 18.7	16.4 \pm 17.7	<0.0001
Viables (%)	78.1 \pm 11.9	64.3 \pm 14.6	35.1 \pm 23.6	<0.0001
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	4.3 \pm 2.5	3.3 \pm 2.0	3.1 \pm 2.8	0.013
Total de alteraciones seminales	1.2 \pm 1.0	1.9 \pm 1.3	3.3 \pm 1.2	<0.0001

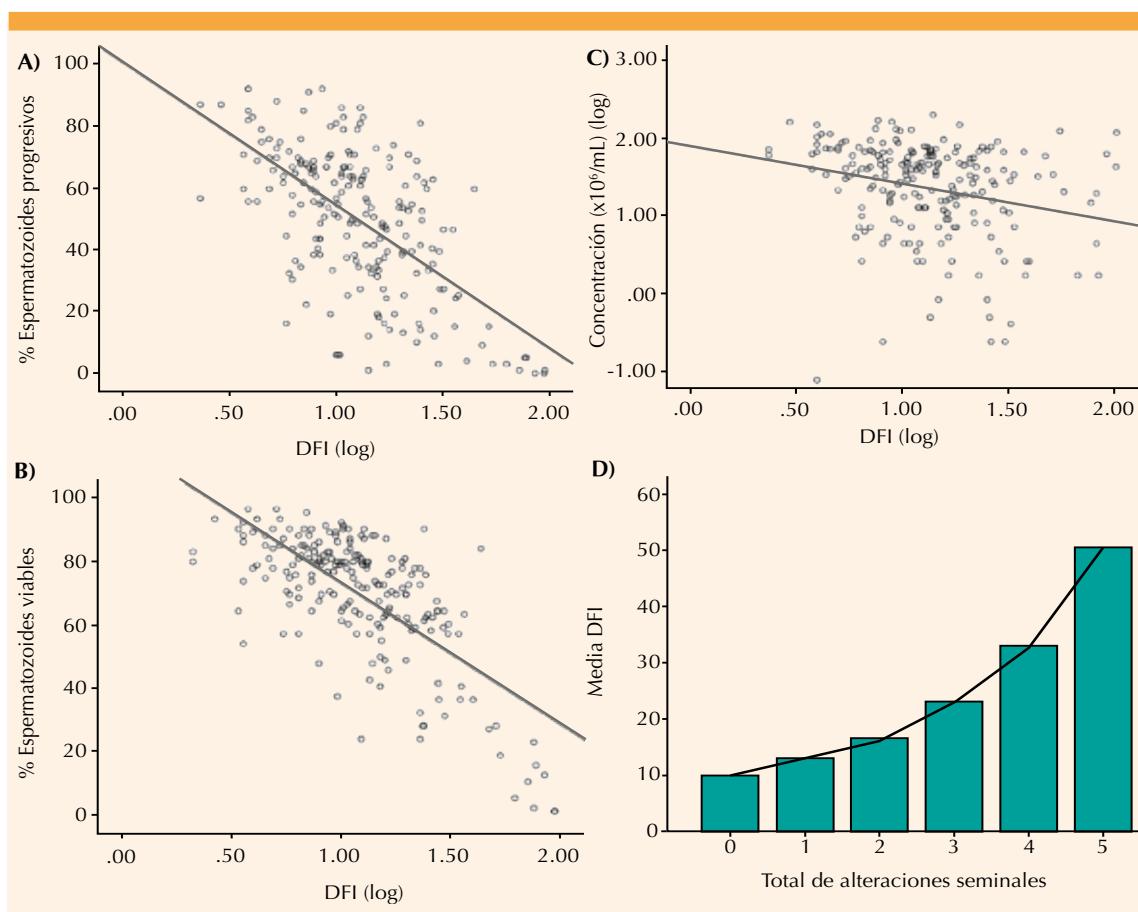


Figura 1. Correlación del DFI (log) con el porcentaje de espermatozoides progresivos (A), con el porcentaje de espermatozoides viables (B) y con la concentración espermática (log) (C). Medias del DFI por cada grupo de alteraciones seminales (D).



las medias de fragmentación de los pacientes con 0, 1, 2, 3, 4 y 5 alteraciones seminales totales fueron del $10.0 \pm 4.9\%$, $13.0 \pm 7.7\%$, $16.2 \pm 12.3\%$, $23.1 \pm 21.5\%$, $32.7 \pm 22.8\%$ y $50.2 \pm 31.8\%$, respectivamente.

Para poder calcular la estimación de riesgo (OR) de las variables relacionadas con la fragmentación del ADN, cada una se transformó a variable dicotómica: fragmentación del ADN (si el índice de fragmentación del ADN es $\geq 15\%$, no: índice de fragmentación del ADN es menor de 15%), fragmentación crítica del ADN (si el índice de fragmentación del ADN es $\geq 30\%$, no: si el índice de fragmentación del ADN es menor de 30%), concentración (muestra con oligozoospermia o sin oligozoospermia), progresivos (muestra con astenozoospermia o sin astenozoospermia), viables (muestra con necrozoospermia o sin necrozoospermia) y número total de alteraciones seminales (menos de tres alteraciones seminales, tres o más alteraciones seminales). Los resultados obtenidos se muestran en el **Cuadro 3**.

La probabilidad de encontrar fragmentación en los pacientes con oligozoospermia es más del doble (OR=2.2) comparada con los pacientes sin oligozoospermia y justo el doble (OR=2.0) en el caso de la fragmentación crítica. La probabilidad de encontrar fragmentación en los pacientes con astenozoospermia es 8 veces mayor (OR=8.0) que en los pacientes sin astenozoospermia y 26 veces mayor cuando hay fragmentación crítica (OR=26.2). La probabilidad de encontrar fragmentación en los pacientes con necro-

zoospermia es 10 veces superior (OR=10.5) comparada con los pacientes sin necrozoospermia y casi 20 veces superior en la fragmentación crítica (OR=19.8). Por último, la probabilidad de encontrar fragmentación en los pacientes con tres o más parámetros seminales alterados es 4.6 veces superior (OR=4.6) comparada con los pacientes con sólo 1, 2 o ninguna alteración en el seminograma y 14 veces mayor en el caso de la fragmentación crítica (OR=14.2).

DISCUSIÓN

Sin ninguna duda, la introducción de las técnicas de reproducción asistida ha revolucionado la atención médica de las parejas infériles por un factor masculino. Sin embargo, en este tipo de técnicas, como el ICSI, existe el riesgo de inyectar espermatozoides con el ADN dañado y que los óvulos sean eficientemente fertilizados.²⁸ La fertilización de un ovocito en metafase II por un espermatozoide con ADN fragmentado puede provocar defectos en el desarrollo embrionario, fallas en la implantación o incremento de las tasas de aborto.¹⁶ Por esto es decisivo identificar y diagnosticar a los pacientes con niveles elevados de fragmentación del ADN espermático para tratarlos adecuadamente antes de los procedimientos de reproducción asistida. Existe un número relativamente alto de mujeres que no pueden lograr el embarazo o que éste no llega a término a pesar de que, aparentemente, no exista algún factor femenino o masculino que pueda causar la infertilidad. En algunos de estos casos la fragmentación del ADN espermático pudiera

Cuadro 3. Estimaciones de riesgo de las diferentes variables analizadas con fragmentación del ADN.

	Fragmentación del ADN ($\geq 15\%$)		Fragmentación crítica del ADN ($>30\%$)	
	Valor OR	IC 95%	Valor OR	IC 95%
Oligozoospermia ($<15 \times 10^6/\text{mL}$)	2.2	1.2-4.0	2.0	0.8-4.7
Astenozoospermia ($<32\%$)	8.0	3.7-17.1	26.2	8.2-83.3
Necrozoospermia ($<58\%$)	10.5	4.1-26.9	19.8	7.1-54.8
3 o más alteraciones seminales	4.6	2.4-7.9	14.2	5.1-39.5

provocar la infertilidad, que es indetectable en el análisis seminal básico.

Si bien el patrón de referencia para la detección de la fragmentación del ADN en muestras seminales es el TUNEL, el test de dispersión de la cromatina espermática es una técnica mucho más accesible para la mayor parte de los laboratorios de fertilización *in vitro* con una elevada sensibilidad y reproducibilidad que ha mostrado resultados similares a la técnica del TUNEL.²⁹

Los resultados de este estudio muestran una importante relación entre algunos parámetros seminales y la fragmentación del ADN obtenida mediante el test de dispersión de la cromatina espermática. El resultado global del seminograma puede predecir el estado en que se encuentra el ADN espermático. Desde un punto de vista general, del total de pacientes que asistieron a nuestra clínica por problemas de fertilidad y que se incluyeron en este estudio, 20.9% resultaron ser normozoospérmicos y 79.1% tuvieron, al menos, un parámetro seminal alterado. Este último valor es mucho mayor al obtenido en el estudio de Godoy y colaboradores,³⁰ en el que el porcentaje de muestras seminales con al menos un parámetro alterado de pacientes que acudieron a la evaluación inicial de la pareja infértil fue de 51%. Sin embargo, en nuestro estudio no se tuvo en cuenta la leucocitospermia ni la hiperespermia.

Con el test de dispersión de la cromatina espermática para determinar la capacidad de dispersión del ADN se observó que los pacientes normozoospérmicos tuvieron, significativamente, menos fragmentación de la cromatina que quienes resultaron con alguna alteración en el análisis seminal ($10 \pm 4.9\%$ vs $27.1 \pm 19.2\%$, respectivamente). Aunque el porcentaje de pacientes normozoospérmicos con fragmentación del ADN no fue despreciable (18.6%), no es extraño encontrar cierto número de

espermatozoides fragmentados en individuos normozoospérmicos porque los mecanismos de reparación del ADN de los espermatozoides son escasos; por lo tanto, es frecuente encontrar daño en el ADN de los espermatozoides humanos, incluso en la población fértil.³¹ No obstante, un número elevado de espermatozoides con fragmentación en una muestra de semen es un factor que puede tener consecuencias importantes en los resultados reproductivos *in vivo* e *in vitro*. Por ello existen puntos de corte que permiten discriminar cuáles muestras seminales pueden tener un efecto adverso en los resultados del tratamiento. En este caso, en el grupo de pacientes normozoospérmicos, 18.6% mostró fragmentación moderada; es decir, por debajo de 30% y no hubo ningún paciente con fragmentación crítica o por encima de 30%. Este 18.6% de hombres con un perfil seminal normal podría contribuir a la infertilidad de la pareja debido al hallazgo de fragmentación del ADN espermático. Si, por el contrario, no se hubiera realizado la prueba de fragmentación, no se habría tenido en cuenta el hombre como fuente de infertilidad en la pareja.

Existen varios estudios que han evaluado la relación entre los parámetros seminales obtenidos del análisis básico del semen con los resultados de la fragmentación del ADN espermático con la aplicación de diferentes métodos. Sin embargo, la mayor parte sólo tienen en cuenta tres parámetros: concentración, movilidad y morfología.³²⁻³⁶ En el seminograma de este estudio se evaluaron todos los parámetros, como reflejo global de la calidad espermática, sin limitación a los tradicionales parámetros comúnmente utilizados. Fue así como se encontró la posible relación de éstos con los resultados de la prueba de fragmentación del ADN espermático.

En nuestro estudio se obtuvieron diferencias significativas entre los tres grupos de fragmentación (normal, moderada y crítica) en los días de abstinencia sexual ($p = 0.043$): en la concentra-



ción espermática ($p = 0.003$), en el porcentaje de espermatozoides viables ($p < 0.0001$), en el porcentaje de espermatozoides progresivos ($p < 0.0001$), en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales ($p = 0.013$) y en el total de alteraciones seminales ($p < 0.0001$). No se observaron diferencias significativas en el volumen del eyaculado ($p = 0.781$) y leucocitos ($p = 0.061$). En estudios previos, el volumen tampoco se asoció con la fragmentación^{34,37} y, aunque la existencia de leucocitos en el eyaculado podría ser un factor determinante en la producción de especies reactivas de oxígeno y, consecuentemente, en la generación de daño en el ADN,^{38,39,40} nosotros no encontramos una relación entre los leucocitos y la fragmentación.

Mediante la aplicación del análisis *post-hoc* para determinar qué medias diferían entre sí, los únicos parámetros que mantuvieron su significación estadística entre los diferentes grupos de fragmentación fueron: la concentración espermática, la movilidad, la vitalidad y el número total de alteraciones observadas en el seminograma. Sorprendentemente, en nuestra población de estudio no se observó ninguna relación entre la morfología y la fragmentación espermática, aunque siempre ha sido un tema muy controvertido en la bibliografía. Existen estudios en los que se ha encontrado una correlación negativa entre el número de espermatozoides morfológicamente normales y el grado de fragmentación del ADN espermático.^{32,35,36,41} Algunos autores creen que los espermatozoides con morfología anormal son más susceptibles de sufrir daño en el ADN debido a una baja calidad en el empaquetamiento de la cromatina que hace que el ADN quede más expuesto a posibles factores dañinos, como las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, también existen otros estudios que, como el nuestro, no han podido encontrar esta relación.^{21,34} Por lo que se refiere a los días de abstinencia, cabría esperar más fragmentación a mayor cantidad de días de abstinencia. En el

estudio efectuado por Wyrobek y colaboradores³⁷ se encontró asociación estrecha entre el índice de fragmentación del ADN y el tiempo de abstinencia sexual, aunque no se mencionan los días de abstinencia del grupo de estudio. Su explicación fue que los espermatozoides que permanecen durante más tiempo en el aparato reproductor masculino pueden experimentar mayor exposición al estrés oxidativo. Sin embargo, en los pacientes de nuestro estudio no fue posible demostrar esta teoría, quizás por la ausencia de abstinencia prolongada.

En cada uno de los tres grupos de fragmentación se estudiaron los parámetros con medias significativamente distintas para evaluar su correlación con el índice de fragmentación del ADN; los porcentajes de espermatozoides progresivos y viables fueron los dos parámetros que más se correlacionaron con el índice de fragmentación del ADN ($r = -0.613$, $r = -0.702$, respectivamente). La concentración también mostró una correlación significativa con el grado de fragmentación; sin embargo, el coeficiente de correlación fue más bajo ($r = -0.248$) comparado con la movilidad y la vitalidad.

Existe bastante unanimidad entre los autores en cuanto a la afectación de la movilidad espermática en las muestras seminales con altos niveles de fragmentación del ADN.^{21,34,36,37,42} Las especies reactivas de oxígeno tienen un papel relevante en la producción de daño al ADN espermático y en los lípidos de su membrana plasmática, en donde impiden la correcta movilidad del espermatozoide.^{37,43}

Los resultados de vitalidad también eran de esperarse porque la fragmentación del ADN sucede en las etapas previas a la muerte celular;⁴⁴ es decir, que durante la apoptosis hay rupturas en la doble cadena del ADN. En la bibliografía está demostrada la relación incuestionable entre la fragmentación del ADN y la vitalidad

espermática.⁴⁵ En coincidencia con estudios previos, nuestros resultados también mostraron una correlación de la concentración con el grado de fragmentación.^{21,34,35,46} También existen otros estudios que no lograron encontrar esta relación^{32,36} o, incluso, ensayos en los que se observó una correlación positiva entre el grado de fragmentación y la concentración espermática.⁴⁷

Uno de los objetivos de este estudio fue el análisis global del seminograma que analiza todos sus parámetros y determina cuántos están fuera de los límites de referencia de la OMS, utilizando el número total de parámetros alterados como un índice de calidad espermática. También se observó que el número total de parámetros alterados en el seminograma sí se relaciona con el grado de fragmentación espermática, con mayores índices de fragmentación del ADN a más parámetros alterados en el seminograma. Virro y colaboradores,⁴⁸ con el método SCSA, observaron que los pacientes con más de 30% de fragmentación espermática tenían, al menos, un parámetro seminal alterado y bajas tasas de formación de blastocisto y de embarazo en curso. En nuestros resultados se obtuvieron tasas de fragmentación moderada a partir de dos parámetros seminales alterados ($16.2 \pm 12.30\%$) y fragmentación crítica a partir de cuatro parámetros alterados ($32.7 \pm 22.81\%$). En los seis pacientes que se registraron con cinco alteraciones seminales, la media de fragmentación fue de $50.2 \pm 31.80\%$.

Al final, con los parámetros relacionados con el índice de fragmentación del ADN se investigó el riesgo de fragmentación moderada o crítica mediante los hallazgos del seminograma. El parámetro seminal que parece evidenciar con más precisión el daño en la cromatina de los espermatozoides es la movilidad. El diagnóstico de astenozoospermia, independientemente de los otros factores seminales que pudieran estar alterados, otorga un riesgo 7.97 veces superior que el de un individuo con movilidad normal

a tener fragmentación moderada y 26.17 veces superior de fragmentación crítica. La necrozoospermia también parece ser un factor predictivo de fragmentación, con un riesgo 10.47 veces superior a la fragmentación moderada y 19.76 de fragmentación crítica. El diagnóstico de oligozoospermia también determinó mayor riesgo de fragmentación; no obstante, es mucho menor que en la astenozoospermia y necrozoospermia (OR=2.16 para la fragmentación moderada y OR=1.91 para la fragmentación crítica). Si se toman como valor de referencia tres o más alteraciones seminales se verá que en este grupo de pacientes el riesgo de fragmentación moderada fue 4.57 veces superior que en pacientes con menos de tres alteraciones seminales y 14.25 veces superior de fragmentación crítica.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados de este estudio, los pacientes con un análisis seminal normal son los que menos se beneficiarán de la prueba de fragmentación porque en nuestro estudio ninguno de ellos tuvo fragmentación crítica del ADN espermático. Se recomienda realizarlo a pacientes en quienes el seminograma reporte astenozoospermia, necrozoospermia u oligozoospermia o en quienes tengan tres o más parámetros seminales alterados. Esta prueba debe considerarse una opción apropiada para evaluar el semen de pacientes, antes de llevar a cabo el ciclo de FIV-ICSI que puede reducir el riesgo de espermatozoides fragmentados para la fertilización y sus efectos adversos en los resultados del procedimiento de reproducción asistida.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed. Switzerland: WHO press; 2010.
2. Andrade-Rocha FT. Semen analysis in laboratory practice: an overview of routine tests. J Clin Lab Anal 2003;17(6):247-258.
3. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. Fertil Steril 2005;84(4):850-853.



4. Spano M, Seli E, Bizzaro D, Manicardi GC, Sakkas D. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17(3):255-260.
5. Lin MH, Lee RKK, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008;90(2):352-359.
6. Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med* 2008;54(3):111-125.
7. Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum Reprod* 2002;17(8):2128-2133.
8. Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Van Steirteghem A. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2006;21(3):685-693.
9. Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, Lewis SEM. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 2013;26(1):68-78.
10. Aitken RJ. Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. *Asian J Androl* 2010;12(1):99-103.
11. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;23(12):2663-2668.
12. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Guerin JF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;87(1): 93-100.
13. Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, de los Santos MJ, Meseguer M. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006;85(2):371-383.
14. Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Alvarez JG, Fernández JL. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl* 2007; 28(1):38-49.
15. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson, et al. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2003;101(6):1229-1235.
16. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93(4):1027-1036.
17. Xia Y, Cheng S, Bian Q, Xu L, Collins MD, Chang HC, Wang X. Genotoxic effects on spermatozoa of carbaryl-exposed workers. *Toxicol Sci* 2005;85(1):615-623.
18. Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2001;16(9):1950-1953.
19. Liu CH, Tsao HM, Cheng TC, Wu HM, Huang CC, Chen CI, Lee MS. DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. *J Asist Reprod Genet* 2004;21(4):119-126.
20. Milazzo JP, Rives N, Mousset-Simeon N, Mace B. Chromosome constitution and apoptosis of immature germ cells present in sperm of two 47, XYY infertile males. *Hum Reprod* 2006;21(7):1749-1758.
21. Mantas D, Angelopoulou R, Msaouel P, Plastira K. Evaluation of sperm chromatin quality and screening of Y chromosome microdeletions in Greek males with severe oligozoospermia. *Arch Androl* 2007;53(1):5-8.
22. Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, Morel F. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril* 2009;92(2):583-589.
23. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, De Jonge C. Halosperm* is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2005;84(4):860.
24. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14(4):1039-1049.
25. Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G, Danish First Pregnancy Planner Study Team. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril* 2000;73(1):43-50.
26. 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* 2000;23(1):25-43.
27. Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 2006;12(4):466-472.
28. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13(7):1864-1871.
29. Ribas-Maynou J, García-Pérez A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, Benet J. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013;1(5):715-722.
30. Godoy-Morales HS, Mamani-Cancino AD, Ponce-Barberena P, Lozano JM, González-Jara LC, Cedillo L, Mera R. Evaluación de los parámetros seminales en parejas con infertilidad. *Rev Mex Reprod* 2012; 5(1):8.

31. Simon, L., Brunborg, G., Stevenson, M., Lutton, D., McManus, J., & Lewis, S. E. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod* 2010;25(7):1594-1608.
32. Rafighdoost, H., Farsi, M. M., Javadi, M., & Khafri, S. Relationship between Sperm Parameters and DNA Fragmentation using a Halosperm Kit. *Anat Sci J* 2013;10(2):79-86.
33. Samplaski, M. K., Dimitromanolakis, A., Lo, K. C., Grober, E. D., Mullen, B., Garbens, A., & Jarvi, K. A. The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13(1):42.
34. Boushaba, S., & Belaaloui, G. Sperm DNA fragmentation and standard semen parameters in Algerian infertile male partners. *World J Mens Health* 2015;33(1):1-7.
35. Aydos, O. S., Yükselten, Y., Kaplan, F., Sunguroğlu, A., & Aydos, K. Analysis of the correlation between sperm DNA integrity and conventional semen parameters in infertile men. *Turk J Urol* 2015;41(4):191.
36. Sheikh, N., Amiri, I., Farimani, M., Najafi, R., & Hadeie, J. Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Iran J Reprod Med* 2008;6(1):13-18.
37. Wyrobek, A. J., Eskenazi, B., Young, S., Arnheim, N., Tiemann-Boege, I., Jabs, E. W. & Evenson, D. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(25):9601-9606.
38. Aitken, R. J., Clarkson, J. S., & Fishel, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989;41(1):183-197.
39. Aitken, R. J., Clarkson, J. S., Hargreave, T. B., Irvine, D. S., & Wu, F. C. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl* 1989;10(3):214-220.
40. Aitken, R. J., Irvine, D. S., & Wu, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species genera-
tion as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164(2):542-551.
41. Sun, J. G., Jurisicova, A., & Casper, R. F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56(3):602-607.
42. Yılmaz, S., Zergeroğlu, A. D., Yılmaz, E., Sofuoğlu, K., Delikara, N., & Kutlu, P. Effects of sperm DNA fragmentation on semen parameters and ICSI outcome determined by an improved SCD test, Halosperm. *Cell J (Yakhteh)* 2010;4(2).
43. Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M., & Giwercman, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006;8(1):11-29.
44. Irvine, D. S., Macleod, I. C., Templeton, A. A., Masterton, A., & Taylor, A. Andrology: A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Hum Reprod* 1994;9(12):2324-2334.
45. Brahem, S., Jellad, S., Ibala, S., Saad, A., & Mehdi, M. DNA fragmentation status in patients with necrozoospermia. *Syst Biol Reprod Med* 2012;58(6):319-323.
46. Moustafa, M. H., Sharma, R. K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M. A., Thomas, A. J., & Agarwal, A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004;19(1):129-138.
47. Shen, H. M., Dai, J., Chia, S. E., Lim, A., & Ong, C. N. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002;17(5):1266-1273.
48. Virro, M. R., Larson-Cook, K. L., & Evenson, D. P. 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(5):1289-1295.