



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

“EVALUACIÓN DEL DAÑO AL ADN Y CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA EN MUESTRAS SEMINALES DE PACIENTES INFÉRTILES”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

BIÓL. MARIO ALBERTO QUINTERO RAMIREZ
Matricula: 2203801603 quinteroramirezmaria@gmail.com

CODIRECTORES

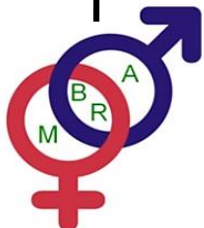
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA
DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

ASESOR

DR. IVÁN URIEL BAHENA OCAMPO

JURADO

PRESIDENTE: DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA
SECRETARIO: DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO
VOCAL: DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
VOCAL: DR. RODOLFO CANSECO SEDANO



IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO 8 DE NOVIEMBRE 2023

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 17 de octubre de 2023

Comisión Académica del Posgrado
Biología de la Reproducción Animal
Presente

|
El(La) que suscribe Mario Alberto Quintero Ramirez alumno(a) con número de matrícula 2203801603, del posgrado Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación Evaluación del daño al ADN y condensación de la cromatina en muestras seminales de pacientes infértiles a desarrollar en UAM-Iztapalapa. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Mario Alberto Quintero Ramirez

Declaración de originalidad

El que suscribe Mario Alberto Quintero Ramirez , alumno del posgrado en Biología de la Reproducción Animal, de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: Evaluación del daño al ADN y condensación de la cromatina en muestras seminales de pacientes infértiles.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestro en Biología de la reproducción Animal es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.

2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.

3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 17 de octubre de 2023.

Atentamente



Mario Alberto Quintero Ramirez

COMITÉ TUTORAL

M. en C. Pedro Cuapio Padilla

Clínica de Reproducción Asistida, HISPAREP

Hospital Español

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Andrología de la Clínica de Reproducción Asistida HISPAREP, Hospital Español, de la Ciudad de México, bajo la codirección del M. en C. Pedro Cuapio Padilla y la Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos.



El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con registro 003797.

Durante la realización de este trabajo el autor fue becario del CONACYT, con número de CVU: 1125183.

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Evaluación del daño al ADN y condensación de la cromatina en muestras seminales de pacientes infértiles” el día 15 de octubre del 2023.



Presidente

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Secretario

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

Dr. Edmundo Bonilla González
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

Dr. Rodolfo Canseco Sedano
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Veracruzana

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, por haberme brindado la oportunidad de realizar estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme una beca.

A la Clínica de Reproducción Asistida HISPAREP, por permitirme ingresar al laboratorio de andrología y haber proporcionado los recursos necesarios para llevar a cabo la investigación.

Al M. en C. Pedro Cuapio Padilla, por la oportunidad de colaborar en su equipo de trabajo, por compartir su conocimiento y su valioso tiempo. Por su apoyo incondicional y orientación para el desarrollo esta tesis, pero sobre todo por su gran calidad humana y empatía. Mi admiración y respeto.

A la Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos, por alentarme a seguir adelante. Por su apoyo, su disponibilidad y valiosos comentarios y observaciones para la mejora de esta tesis.

Al Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo, por su tiempo invertido, sus valiosas observaciones y comentarios en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Edmundo Bonilla González, por su disponibilidad y apoyo en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura, por los comentarios, sugerencias y disponibilidad para la revisión de este trabajo.

Al Dr. Rodolfo Canseco Sedano, por aceptar ser parte del jurado del examen.

Dedicatoria

A Dios, a la vida, por poder culminar esta etapa.

A mis padres, María Elena y Carlos, por su apoyo y amor incondicional, por ser mi soporte porque sé que siempre puedo contar con ustedes, recibir un abrazo cálido, un beso en la mejilla o tener palabras de aliento cuando las cosas no van bien, por motivarme y creer en mí. Los amo con todo mi corazón.

A mi abuela, Mercedes, porque eres como una segunda madre para mí, gracias por tus enseñanzas y por lo que me has dado. Eres mi gran amor.

A mis hermanos, Hugo, José y Brenda, porque ustedes son parte de mí, gracias por apoyarme incondicionalmente y celebrar juntos cada pequeño logro.

A mi sobrino, Matías, por llegar a darnos alegría.

“Todo el mundo debería recibir una ovación del público puesto en pie al menos una vez en la vida, porque todos vencemos al mundo”.

-August Pullman

Índice

Lista de figuras	3
Lista de tablas	3
Abreviaturas	4
Resumen	5
Abstract	6
I. Introducción	7
1.1 Aspectos históricos de la Embriología humana	8
1.2 Anatomía del aparato reproductor masculino	10
1.3 Biología celular de los espermatozoides	13
1.4 Eje hipotálamo-hipófisis-testículo	14
1.4.1 Células de Sertoli	16
1.4.2 Células de Leydig	17
1.5 Espermatogénesis	18
1.6 Espermiogénesis	23
1.7 Espermatozoide	25
1.8 Análisis seminal	27
1.9 Infertilidad masculina	29
2. Fragmentación del ADN de los espermatozoides	31
2.1 Tipos de fragmentación del ADN de los espermatozoides	32
3. Estrés oxidante	33
3.1 Técnicas para la evaluación de la fragmentación del ADN de los espermatozoides	34
3.1.1 Ensayo de la dispersión de la cromatina espermática	35
3.2 Cromatina espermática	36
3.2.1 Compactación nuclear del espermatozoide	37
3.2.2 Proteínas de transición	37
3.3 Tinción azul de anilina (AB)	39
3.4 Tinción azul de toluidina (TB)	39
II. Antecedentes	40
III. Justificación	45
IV. Pregunta de investigación	46

V. Hipótesis	46
VI. Objetivos	46
6.1 Objetivo general	46
6.2 Objetivos específicos	47
VII. Materiales y métodos.....	47
7.1 Diseño experimental	47
7.2 Diseño del estudio y autorización ética	49
7.3 Población de estudio	49
7.4 Participantes	50
7.5 Examen y análisis de semen	50
7.6 Ensayo de la dispersión de la cromatina espermática	51
7.7 Determinación de la integridad de la cromatina TB	52
7.8 Determinación de la inmadurez de la cromatina AB	52
7.9 Análisis estadístico	53
VIII. Resultados	54
IX. Discusión de resultados.....	62
X. Conclusiones.....	74
XI. Perspectivas	75
XII. Referencias	76
XIII. Anexo.....	90
13.1 Dictamen del comité hospitalario de bioética.....	90
13.2 Consentimiento informado.....	93

Lista de figuras

Figura 1. Ilustración que esquematiza el sistema reproductor masculino y las vías espermática-----	10
Figura 2. Esquema que indica la regulación hormonal en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo-----	16
Figura 3. Proceso de la espermatogénesis desde la espermatogonia B hasta los espermatozoides-----	22
Figura 4. Diagrama de las principales etapas de la espermiogénesis-----	24
Figura 5. Esquema que muestra las partes estructurales del espermatozoide: cabeza, pieza media y un flagelo-----	25
Figura 6. Esquema que muestra los factores intrínsecos y extrínsecos que producen infertilidad en el varón-----	31
Figura 7. Diagrama de flujo que representa el diseño experimental -----	48
Figura 8. Fotografía por microscopio óptico durante la prueba SCD. -----	59

Lista de tablas

Tabla 1. Parámetros seminales según la OMS 2021 (6ª edición)-----	28
Tabla 2. Edad del paciente y volumen de semen entre los grupos donantes e infértiles-----	54
Tabla 3. Comparación de los parámetros seminales y el índice de fragmentación del ADN-----	55
Tabla 4. Etiologías y parámetro seminales entre los diferentes grupos-----	56
Tabla 5. Correlación entre el índice de fragmentación del ADN espermático y los parámetros del semen-----	57
Tabla 6. Resultados de azul de anilina (AB) en grupos infértiles y donantes-----	60
Tabla 7. Resultados de azul de toluidina (AT) en grupos infértiles y donantes-----	61

Abreviaturas

AB-Azul de anilina

ABP-Proteína de unión a andrógenos

ADN-Ácido desoxirribonucleico

ARC-Núcleo arqueado

ARNm-Ácido ribonucleico mensajero

ARNr- Ácido ribonucleico ribosómico

ARNt- Ácido ribonucleico de transferencia

ART-Tecnología de reproducción asistida

ATP-Adenosín trifosfato

AVPV-Núcleo periventricular anteroventral

CAT-Catalasa

COMETA-Ensayo de electroforesis en gel unicelular

DE-Desviación estándar

DFI-Índice de fragmentación del ADN

PRM-Protamina

ROS-Especies reactivas de oxígeno

SCD-Dispersión de la cromatina espermática

SCSA-Ensayo de estructura de cromatina espermática

SDF-Fragmentación del ADN espermático

SG -Estrés oxidativo

SOD-Superóxido dismutasa

DSB-Roturas de doble cadena

FIV-Fertilización *in vitro*

FSH- Hormona folículo estimulante

GnRH-Hormona liberadora de gonadotropina

GPX-Guayacol peroxidasa

HPT-Eje hipotálamo-hipófisis-testículo

ICSI-Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

LH-Hormona luteinizante

MAR-Regiones de unión a matriz

NH-Núcleo histona

NP-Núcleo protamina

OMS-Organización Mundial de la Salud

PeN-Núcleo continuo periventricular

PGCs-Células germinales primordiales

PRISMA- Ítems de información preferidos para revisiones sistemáticas y metaanálisis

SSB-Roturas monocatenarias

SSC-Células madre espermatoγονiales

TB-Azul de Toluidina

Tnps-Proteínas de transición

TPC-Células peritubulares testiculares

TUNEL-Marcado terminal de desoxinucleotidiltransferasa dUTP

Resumen

Uno de los principales factores para lograr el éxito de la reproducción humana es la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los espermatozoides, esencial para la fertilización y el desarrollo adecuado de un organismo. El daño en el ADN de los espermatozoides se reconoce como un biomarcador importante de la infertilidad masculina y se sabe que influye tanto en la reproducción natural como la asistida. Los mecanismos involucrados en la fragmentación del ADN espermático (SDF; del inglés sperm DNA fragmentation) incluyen espermatogénesis anormal, daño por estrés oxidante y apoptosis, entre otros. Los objetivos del presente estudio fueron investigar la relación entre el índice de fragmentación del ADN (DFI; del inglés DNA fragmentation index) y la calidad seminal, además de evaluar la calidad de la cromatina espermática. Respecto al DFI y calidad seminal, se analizaron 144 varones: 42 fueron donantes y 102 pacientes infértiles. Para las pruebas de la cromatina espermática, se analizaron 100 varones: 42 fueron donantes y 58 pacientes infértiles, todos ellos atendidos en la Clínica de Reproducción Asistida del Hospital Español (HISPAREP), de la Ciudad de México. Los parámetros espermáticos se realizaron de acuerdo con la edición del 2021 del “Manual de laboratorio para el examen y procesamiento del semen humano”, de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los DFI se estimaron mediante el ensayo de dispersión de cromatina espermática (SCD; del inglés sperm chromatin dispersion test). Se observó una diferencia significativa en el DFI entre los grupos donantes e infértiles, así como en los parámetros seminales de concentración, motilidad y morfología ($p < 0.05$). Asimismo, la relación entre los DFI y los parámetros de semen presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con correlación negativa. Por otro lado, al analizar la calidad de la cromatina espermática, mediante las tinciones con azul de anilina (AB; del inglés aniline blue) y de toluidina (TB; del inglés toluidine blue), se observaron porcentajes elevados de cromatina dañada en los pacientes infértiles en relación con los varones fértiles, lo que sugiere que el daño al ADN espermático se asocia con el DFI en los pacientes. Se concluye que la determinación del DFI de los espermatozoides se puede complementar con el análisis de la calidad de la cromatina para la evaluación del potencial de fertilidad masculina. Esto permitirá brindar herramientas diagnósticas de la función e integridad de los espermatozoides en los estudios de infertilidad masculina.

Abstract

One of the main factors to successfully achieve human reproduction is the integrity of the deoxyribonucleic acid (DNA) of sperm, essential for fertilization and proper development of an organism. Sperm DNA damage is recognized as an important biomarker of male infertility and it is known this can influence both natural and assisted reproduction. The involved mechanisms on the sperm DNA fragmentation (SDF) include abnormal spermatogenesis, oxidative stress damage and apoptosis, among others. The objectives of this study were to investigate the relationship between the DNA fragmentation index (DFI) and seminal quality, as well as to evaluate the quality of sperm chromatin. Regarding DFI and semen quality, 144 males were analyzed: 42 were donors and 102 were infertile patients. For sperm chromatin testing, 100 males were analyzed: 42 were donors and 58 were infertile patients, all of them attended at the Assisted Reproduction Clinic of the Spanish Hospital (HISPAREP, in Spanish Clínica de Reproducción Asistida del Hospital Español), Mexico City. Sperm parameters were performed according to the 2021 edition of the “Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen”, from the World Health Organization (WHO). The DFI were estimated using the sperm chromatin dispersion test (SCD). A significant difference was observed in the DFI between donor and infertile groups, as well as in seminal parameters of concentration, motility, and morphology ($p < 0.05$). Likewise, the relationship between DFI and semen parameters presented significant differences ($p < 0.05$) with negative correlation. On the other hand, when analyzing the quality of sperm chromatin, using aniline blue (AB) and toluidine (TB) stains, high percentages of damaged chromatin were observed in infertile patients compared to fertile males, suggesting that DNA damage is associated with DFI in patients. It is concluded that the determination of sperm DFI can be complemented by chromatin quality analysis for the assessment of male fertility potential. This will provide diagnostic tools for sperm function and integrity in male infertility studies.

I. Introducción

La infertilidad masculina es un creciente problema de salud mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad en el mundo afecta a 1 de cada 6 parejas, donde el 50% de las cuales se deben al factor masculino (Szabó *et al.*, 2023). La evidencia demuestra que la fragmentación del ADN espermático (SDF; del inglés sperm DNA fragmentation) puede causar infertilidad masculina afectando negativamente el potencial de fertilización de los espermatozoides, especialmente cuando los niveles de SDF son altos (Zhang *et al.*, 2023). La SDF es el resultado de mecanismos relacionados con la maduración defectuosa del espermatozoide, incluyendo apoptosis abortiva y el estrés oxidativo (SG; del inglés oxidative stress), además, factores de riesgo clínicos (edad, infecciones, cánceres, desequilibrios hormonales, obesidad, diabetes, entre otros) y ambientales (exposición al calor, toxinas ambientales, radiación, tabaquismo, abuso de drogas, dieta) (Agarwal *et al.*, 2020).

Actualmente, el análisis seminal se considera la piedra angular para evaluar la capacidad fertilizante de los espermatozoides en los laboratorios de andrología; sin embargo, se ha reportado que existen limitaciones como la incapacidad para diferenciar con precisión a los hombres fértiles de los infértiles, por lo que se necesita la implementación de técnicas complementarias para un diagnóstico más certero (Panner & Agarwal, 2018; Boitrelle *et al.*, 2021). Por lo tanto, es importante discutir la importancia clínica de las pruebas de integridad del ADN espermático en relación con el examen convencional de los parámetros del semen en pacientes infértiles y donantes.

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad seminal, la fragmentación del ADN, el grado de compactación y la estabilidad de la cromatina espermática para determinar su correlación con la infertilidad masculina.

1.1 Aspectos históricos de la Embriología humana

A lo largo de la historia de la humanidad ha existido la inquietud de saber: ¿Cómo nos originamos? y ¿de dónde venimos? La búsqueda de estas respuestas inició con Hipócrates de Cos y Aristóteles quienes sentaron las bases de la Embriología como ciencia, describiendo en sus trabajos el desarrollo embrionario de pollos, entre otras aportaciones. Posteriormente, en el siglo II Galeno escribió su obra titulada “*Sobre la formación del feto*”, mientras que, en el Talmud, el Corán y en tratados sánscritos ya se hacía referencia del desarrollo embrionario aportando información sobre los primeros estadios del desarrollo (Arteaga & García, 2021). Más tarde, Harvey, en su libro de 1651: “*Generazione Animalium*” concluyó que en el útero se producía una nueva vida después del coito y que los “huevos” producido en las hembras se generaban como el pensamiento, mientras que los “testículos” como el los llamaba, en la mujer, no desempeñaban ninguna función importante en la generación de un individuo (Cobb, 2012).

Nicolás Steno, en el año de 1668, por sus investigaciones había llegado a la conclusión de que las vesículas en los "testículos" de la mujer eran, o contenían, óvulos. Por otra parte, Reinier de Graaf, en el año de 1672, describió los ovarios y folículos de conejos, siendo las primeras aportaciones del descubrimiento del gameto femenino (Arteaga & García, 2021; Cobb, 2012). El descubrimiento del espermatozoide o gameto masculino tuvo lugar durante el siglo XVII por Antonie van Leeuwenhoek, quien construyó un microscopio para estudiar el semen humano, de esta manera se creía que el espermatozoide era portador

de una versión minúscula y preformada del nuevo ser y que requería del terreno adecuado para poder implantarse y desarrollarse (Cobb, 2012; Clift & Schuh, 2013).

En 1817, Heinrich Christian Von Pander publicó el concepto de “blastodermo”, las tres capas germinativas en el embrión (Arteaga & García, 2021), retomando estos trabajos, Karl Ernst von Baer escribió: “las características básicas y generales de cualquier grupo animal aparecen más temprano en el desarrollo de lo que lo hacen las características especiales que son particulares a los diferentes miembros del grupo” (Arteaga & García, 2021). Más tarde, Schleiden y Schwann postularon que el óvulo y el espermatozoide son algo semejantes en el sentido de que ambos son células (Cobb, 2012; Clift & Schuh, 2013).

Al mismo tiempo, se estaba haciendo evidente que el fenómeno ampliamente observado de la herencia debía involucrar factores que están contenidos dentro del óvulo y el espermatozoide, respectivamente. En 1876, Oscar Hertwig, hizo el descubrimiento de la fertilización en erizos de mar y Hertwig, observó que los núcleos de espermatozoides y óvulos se fusionaban durante la fertilización, proporcionando así una base para la herencia genética y resolviendo el debate sobre el papel del óvulo y el espermatozoide en la generación de un nuevo individuo (Clift & Schuh, 2013).

Posteriormente, Wilhem Roux, introdujo el término de “la mecánica del desarrollo” que permitió entender las interacciones tisulares y celulares que se llevan a cabo en el desarrollo, mientras que, Hans Spemann retomando estos trabajos recibió el Premio Nobel por su descubrimiento en la morfogénesis: la inducción primaria. En la década de 1940, Streeter elaboró una clasificación para la etapa embrionaria en primates y donde también incluyó a los humanos permitiendo identificar la edad morfológica del embrión (Arteaga & García, 2021). Otro hecho importante, ocurrió en 1978, cuando Edwards y Steptoe, médicos

británicos, dieron a conocer el primer nacimiento concebido con las Tecnologías de Reproducción Asistida (ART). A su vez, esta búsqueda de respuestas también ha permitido entender y comprender acerca de los mecanismos encargados de la regulación génica del desarrollo, a partir de la Biología molecular, como el descubrimiento de genes involucrados en estos procesos. En el año de 1995, por sus descubrimientos en el control genético del desarrollo embrionario temprano Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard y Eric F. Wieschaus recibieron el Premio Nobel de Fisiología, permitiendo comprender la evolución normal de un embrión (Arteaga & García, 2021).

1.2 Anatomía del aparato reproductor masculino

El aparato reproductor masculino está compuesto por las gónadas y los órganos accesorios, cuya función principal es producir espermatozoides o gametos masculinos; también sintetizan testosterona, responsable del desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales masculinos secundarios (**Fig. 1**) (Arteaga & García, 2021).

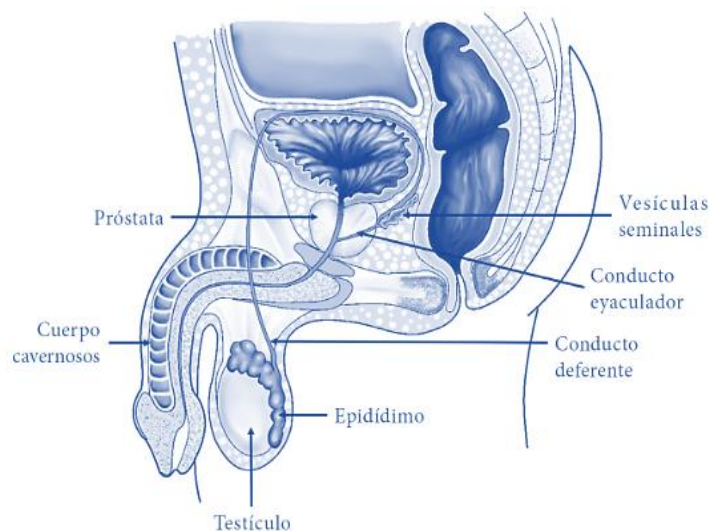


Figura 1. Ilustración que esquematiza el sistema reproductor masculino y las vías espermáticas. Los órganos genitales masculinos comprenden órganos genitales externos (testículos, escroto, pene) órganos genitales internos (conductos deferentes, vesículas seminales, conductos eyaculadores) y órganos genitales auxiliares (próstata, glándula bulbouretral). Tomado de Luque, 2021.

Las gónadas masculinas son los testículos, lugar donde tiene lugar la espermatogénesis, son órganos ovoideos, de consistencia dura, situados dentro de la bolsa escrotal, se encuentran rodeados por una capa gruesa de tejido conectivo que forma la túnica albugínea, donde se encuentran los túbulos seminíferos. Se originan en el mesonefros a nivel lumbar y descienden retroperitonealmente siguiendo el gubernáculo del testículo (*gubernaculum testis*), un cordón de mesénquima que los dirige a la pared inguinal hasta su localización final en las bolsas escrotales (Bruce, 2019).

El objetivo principal de las vías espermáticas, son las de transportar los espermatozoides desde los túbulos seminíferos hasta la uretra para ser expulsados durante la eyaculación, los cuales pueden ser de dos tipos: intratesticulares, túbulos seminíferos, túbulos rectos, *rete testis* y conductos eferentes y las vías espermáticas extratesticulares: epidídimo, conductos deferentes y conducto eyaculador (Moore *et al.*, 2020).

Los túbulos rectos son extensiones de los túbulos seminíferos y se ubican cercanos al mediastino testicular; están revestidos por epitelio cúbico o cilíndrico bajo simple con células de Sertoli; se continúan a nivel del mediastino testicular con la *rete testis* (Moore *et al.*, 2020).

La *rete testis* (red testicular) es un conjunto de canales anastomosados ubicados dentro del mediastino testicular; consisten en un epitelio plano a cúbico simple con microvellosidades. El número de conductos eferentes varía de 10 a 20 y son los responsables de la comunicación de la *rete testis* con el epidídimo. El número de conductos eferentes varía de 10 a 20 y son los responsables de la comunicación entre la *rete testis* con el epidídimo. Los conductos eferentes consisten en un epitelio cubico simple con microvellosidades que contienen dos tipos de células: (a) células ciliadas, que ayudan a impulsar los espermatozoides inmóviles hacia el epidídimo; (b) células absortivas, que son responsables

de la absorción de líquido intersticial en el cual están inmersos los espermatozoides (Bruce, 2019; Moore *et al.*, 2020).

El epidídimo, es una estructura formada por un conducto contorneado y conglomerado sobre sí mismo, en forma de coma, de aproximadamente 4 cm de longitud, localizado en la superficie superior y posterolateral de cada testículo, revestido con epitelio cilíndrico pseudoestratificado y recubierto por capa de músculo liso. Aquí es donde se almacenan los espermatozoides y comienza el proceso de capacitación. El epidídimo se divide en cabeza, cuerpo y cola, y transporta a los espermatozoides hasta las vesículas seminales, que forman el conducto eyaculador, mediante la contracción peristáltica del músculo liso durante la excitación sexual (Bruce, 2019).

Las vesículas seminales son estructuras ovales de unos 3 cm de largo, ubicadas en la base de la vejiga, las cuales producen una secreción que se une con el espermatozoide, que viaja a través del conducto eyaculador de unos 2.5 cm de largo hacia la próstata, donde desemboca en la uretra prostática. La próstata es la glándula accesoria más grande del sistema reproductor masculino, pesa alrededor de 20 g y consta de alvéolos cubiertos por un epitelio columnar alto. Está dividido en varios lóbulos por la uretra prostática y los conductos eyaculadores, el primero de los cuales se descarga secreciones prostáticas y es añadido el líquido seminal por conductillos prostáticos, que desemboca en la pared posterior de la uretra prostática (Bruce, 2019; Moore *et al.*, 2020).

La uretra prostática está conectada con la uretra membranosa, de aproximadamente 1 cm de largo, rodeada por un esfínter uretral y a cada lado se acompaña por una glándula bulbouretral o de Cowper, que secretan sustancias alcalinas durante la excitación y protegen a los espermatozoides. La uretra membranosa es continuada por una uretra esponjosa, cuya

estructura es de aproximadamente 15 cm de largo, atraviesa el pene y termina en el orificio externo de la uretra, a través de la cual se comunica con el exterior; hacia su parte superior llegan los conductos de la glándula bulbouretral, por donde se depositan secreciones, para que se una con el eyaculado (Moore *et al.*, 2020).

1.3 Biología celular de los espermatozoides

Las células germinales primordiales (PGCs; del inglés primordial germ cells) son un grupo de células precursoras de los gametos masculinos y femeninos, su origen es extraembrionario y migran hacia las gónadas en desarrollo durante el desarrollo temprano del embrión, donde se diferenciarán en ovocitos y espermatozoides (Larose *et al.*, 2019 & Siu *et al.*, 2021).

Cuando se produce la fecundación, un ovocito se une con un espermatozoide para formar un cigoto y comienza una fase de proliferación mitótica, aumentando de forma exponencial de cientos a millones. Una vez que el embrión alcanza la etapa de blastocisto, se diferencia en dos tipos celulares: la capa epitelial externa del trofoblasto y la indiferenciada masa celular interna. Más tarde, la masa celular interna se divide en 2 capas: el epiblasto interior o ectodermo embrionario y el endodermo primitivo exterior. Estas dos capas están definidas por una intersección y entonces las células no se mezclan (He *et al.*, 2009; Larose *et al.*, 2019).

Las PGCs surgen a partir de células en el epiblasto derivado de la masa celular interna. Entre las 2 y 4 semanas después de la fecundación, un grupo de células en el interior del ectodermo primario se desprenden del ectodermo y migran dentro de una estructura extraembrionaria llamada saco vitelino, el cual está situado cerca de la alantoides en

desarrollo (Arteaga & García, 2021). En aproximadamente 5-6 semanas del desarrollo fetal humano, las células germinales primordiales migran hacia el saco vitelino adyacente, traspasan la porción posterior del tubo digestivo en formación hacia la pared del tubo intestinal y luego a través del mesenterio hacia la pared dorsal del cuerpo. Cuando las células germinales primordiales traspasan el mesenterio, se dividen en 2 poblaciones ya sea hacia el lado derecho o hacia el izquierdo de la pared dorsal. Entre las 6 y las 12 semanas, las células germinales primordiales llegan a la región llamada gónada presuntiva, que es el destino final. Las células germinales primordiales inducen la formación de la cresta gonadal, la gónada primordial. Después de la diferenciación sexual, las células germinales primordiales se diferencian en ovogonias en el ovario o espermatogonias en los testículos (He *et al.*, 2009).

1.4 Eje hipotálamo-hipófisis-testículo

Las funciones reproductivas masculinas están reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HPT, del inglés hypothalamic-pituitary-testis), en el vértice de este eje hay dos poblaciones neuronales hipotalámicas necesarias para la fertilidad: las neuronas kisspeptina y las neuronas de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH; del inglés Gonadotropin-releasing hormone) (Sen & Hoffmann, 2020). La secreción de GnRH requiere la acción estimulante de la kisspeptina, producida por las neuronas kisspeptina ubicadas principalmente en el núcleo arqueado (ARC; del inglés arcuate nucleus) y el núcleo periventricular anteroventral / núcleo continuo periventricular (AVPV / PeN) del hipotálamo (Padda *et al.*, 2021; Sengupta *et al.*, 2021).

La GnRH es una hormona peptídica compuesta de 10 aminoácidos y se sintetiza como una prohormona de 69 aminoácidos de longitud. Produciendo GnRH madura por escisión enzimática; por una secreción pulsátil que estimula los gonadotrofos ubicados en la parte

anterior de la hipófisis anterior (adenohipófisis) y es transportada a través de la vía porta (Manotas *et al.*, 2022). El hipotálamo es una de las áreas más conservadas a lo largo de la evolución y juega un papel crucial en el cerebro de los mamíferos. Es uno de los principales componentes del diencefalo, que permite a los mamíferos mantener la homeostasis, y su destrucción es incompatible con la vida (Araujo *et al.* 2020). El hipotálamo abarca un área relativamente pequeña dentro del cerebro en la porción ventral del diencefalo, justo debajo del tálamo y controla muchas funciones corporales, incluyendo: comer, beber, funciones y comportamientos sexuales, presión arterial, frecuencia cardíaca, mantenimiento de la temperatura corporal, el ciclo de sueño-vigilia y estados emocionales (por ejemplo, miedo, dolor, ira y placer) (Ramaswamy & Weinbauer, 2015).

Posteriormente, la GnRH se une a sus receptores en los gonadotropos y estimula la liberación de las gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH; del inglés luteinizing hormone) y la hormona foliculoestimulante (FSH; del inglés follicle stimulating hormone) (**Fig. 2.**) (Manotas *et al.*, 2022). Estos se liberan sistémicamente y dirigen sus receptores: las gónadas, donde se unen y estimulan la liberación de hormonas esteroides (estrógenos, progestinas y andrógenos tanto en mujeres como en hombres). En la gónada masculina, la LH actúa directamente sobre las células de Leydig, induciendo la síntesis de testosterona a partir del colesterol. Por otro lado, la FSH induce el inicio de la espermatogénesis en las células de Sertoli (Manotas *et al.*, 2022; Recchia *et al.*, 2021). Estas hormonas esteroides sexuales se transportan a través del sistema circulatorio como se mencionó anteriormente y, como parte de sus actividades, se retroalimentan en la hipófisis y el hipotálamo, inhibiendo la liberación de GnRH y LH, completando un circuito de retroalimentación negativa) (**Fig. 2.**) (Recchia *et al.*, 2021; Larose *et al.*, 2019).

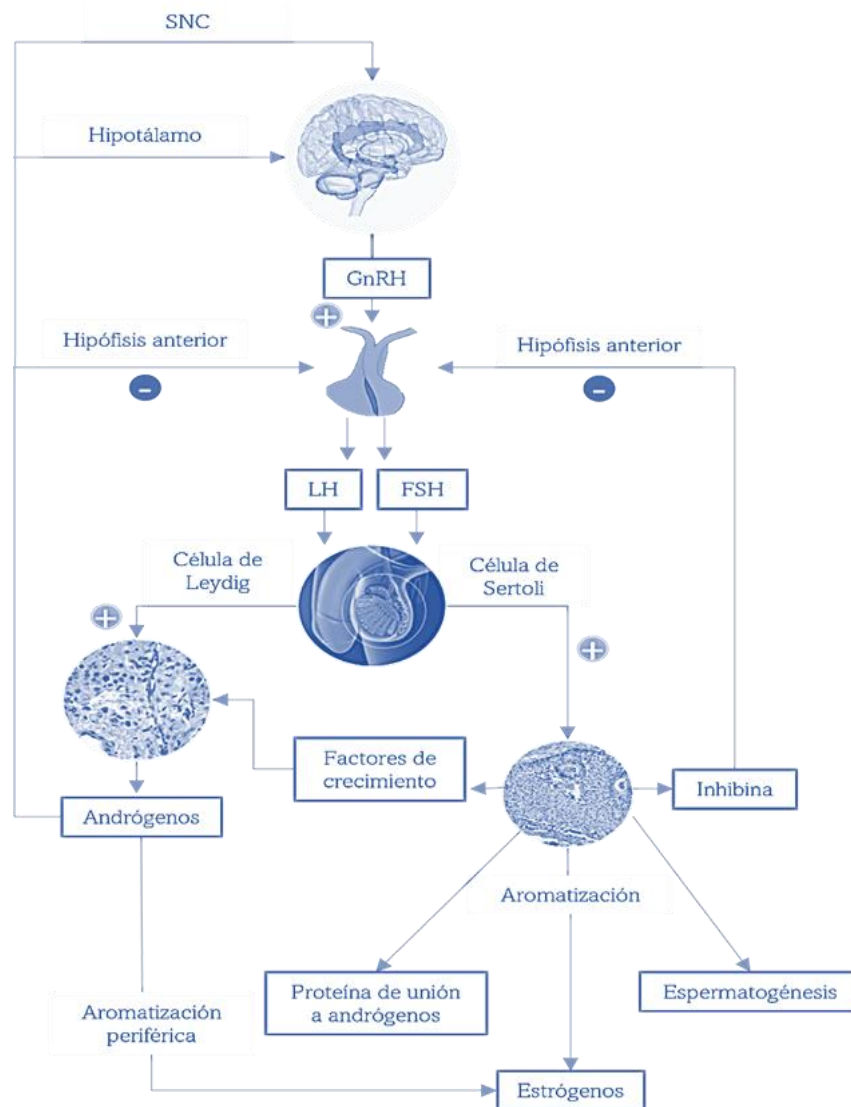


Figura 2. Esquema que indica la regulación hormonal en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Dentro del hipotálamo, ciertos núcleos liberan GnRH las cuales actúan sobre una población de células gonadotropas de la adenohipófisis, las cuales liberan gonadotropinas (LH y FSH) que viajan a su órgano blanco, el testículo donde ejercen su acción (Elaboración propia).

1.4.1 Células de Sertoli

Las células de Sertoli son cruciales en el proceso de espermatogénesis, promoviendo así la producción de espermatozoides viables. Las células de Sertoli también secretan una miríada de moléculas importantes, incluida la proteína de unión a andrógenos (ABP), la inhibina B y la activina (Wong & Khan, 2022). Estas secreciones promueven directa o

indirectamente la espermatogénesis a través de un sistema de retroalimentación negativa hormonal (Wong & Khan, 2022). Las células de Sertoli también responden a las hormonas hipofisarias, principalmente la FSH, para iniciar el proceso de espermatogénesis, atrayendo así espermatogonias adyacentes (Wong & Khan, 2022).

Morfológicamente, son las células más grandes de forma irregular, en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos. Se identifican por ser siempre la célula columnar más grande que todavía está unida a la lámina basal de la membrana basal, y se extienden hasta la luz apical del túbulo seminífero. Entre otras funciones están las de secretar un compuesto llamado factor inhibidor mulleriano, que ayuda a prevenir el desarrollo de los órganos sexuales femeninos después de la determinación de los testículos embriológicamente, ayudan a apoyar, proteger y proporcionar nutrición a las células espermatogénicas, regulan el metabolismo del colesterol en el momento de la espermatogénesis, forman de una barrera hematotesticular por uniones estrechas entre ellas, desempeñan un papel en el control paracrino y endocrino de la espermatogénesis entre otras (Wong & Khan, 2022).

1.4.2 Células de Leydig

Las células de Leydig son células localizadas en los testículos, específicamente rodeando los túbulos seminíferos (intersticio), que contienen células de Sertoli y diferentes tipos celulares. También se les conocen como células intersticiales testiculares (Aladamat & Tadi, 2022). Morfológicamente, son células poligonales con citoplasma eosinofílico y un gran núcleo redondo con un nucléolo prominente y se pueden encontrar formando grupos hasta de diez células. El contenido de lípidos es abundante (Aladamat & Tadi, 2022). Las células de Leydig son la principal fuente de testosterona o andrógenos en los hombres. Esta fisiología les permite desempeñar un papel clave en muchos procesos fisiológicos

importantes en los hombres, incluida la espermatogénesis, el control del desarrollo sexual y el mantenimiento de las características y comportamientos sexuales secundarios, bajo la regulación principal de la LH (Aladamat & Tadi, 2022). Los andrógenos se difunden desde el intersticio hacia túbulos seminíferos para actuar sobre las células germinales y de Sertoli, induciendo y manteniendo la producción de espermatozoides (Aladamat & Tadi, 2022).

1.5 Espermatogénesis

Es un mecanismo ordenado encargado de la producción y maduración de células madre espermatogoniales (SSC; del inglés spermatogonial stem cells) diploides hasta espermatozoides haploides, la cual se lleva a cabo por una serie de etapas o fases que incluyen: fase proliferativa, crecimiento y maduración; suscitándose una serie de divisiones y diferenciaciones celulares sucesivas en los túbulos seminíferos localizados en los testículos de los mamíferos (Mundt *et al.*, 2022; Kubota & Brinster, 2018). Posteriormente, el proceso de espermiogénesis convierte las espermátidas en espermatozoides, reconociéndose cuatro etapas: la fase de Golgi, la de casquete, la acrosomal y finalmente la de maduración, en donde se observan espermatozoides alargados maduros que se liberan a la luz del tubo seminífero en un proceso llamado espermiación del cual se hablará más adelante (Siu *et al.*, 2021).

Los túbulos seminíferos comprenden un tejido especializado subdividido en tres compartimentos: la luz, el epitelio germinal y la pared tubular. Este último está compuesto por proteínas de la matriz extracelular y células peritubulares testiculares (TPC; del inglés testicular peritubular cells) planas similares a los músculos lisos. El epitelio germinal comprende dos tipos de células: células somáticas de Sertoli y células germinales en desarrollo (Mundt *et al.*, 2022). Es importante señalar que este mecanismo da inicio en la

etapa de la pubertad con un ciclo de duración aproximada de 74 días en la especie humana (Hofmann, 2008).

Durante esta etapa la espermatogénesis implica cuatro eventos distintos: la autorrenovación de las células madre que mantiene la producción continua de células germinales a lo largo de la vida, la proliferación y diferenciación espermatogonial que amplifica el número de células premeióticas, la meiosis en los espermatocitos y la espermiogénesis. La fase proliferativa comienza con las espermatogonias, las cuales se localizan en la lámina basal del túbulo seminífero por prolongaciones entrelazadas de las células de Sertoli, unidades complejas de distribución regular a lo largo de la periferia del epitelio seminífero (Bruce, 2019).

A través de señales moleculares, como la vía de señalización Janus quinasa/transductor de señal y activador de la transcripción (JAK/STAT), la cual se identificó por primera vez para estimular la autorrenovación y el mantenimiento de las SSC, también se ha reportado que la vía PI3K / Akt también se ha implicado en la regulación diferenciadora de espermatogonias, así como la señalización *Smad* que ha sido implicada en el mantenimiento y pluripotencia de las SSC humanas (He *et al.*, 2009).

La maduración de las espermatogonias se origina desde la base del túbulo seminífero a la luz y surgen en el saco vitelino aproximadamente en la tercer semana de gestación migrando a la gónada indiferenciada y posicionándose en los cordones sexuales (túbulos seminíferos) de los testículo, es importante señalar que existen varios tipos: las espermatogonias indiferenciadas, denominadas como A, y las espermatogonias en proceso de diferenciación que se denominan A1, A2, A3, A4, In y B (Phillips *et al.*, 2010).

Particularmente, en el humano hay tres tipos de espermatogonias denominadas: A oscuras, A claras y B, en las cuales ocurre una serie de divisiones mitóticas. Las espermatogonias A oscuras se caracterizan por tener una forma ovoide, al igual que su núcleo, presenta una cromatina finamente granular tiñéndose intensamente con colorantes, por su alta afinidad, además posee un nucleolo excéntrico bajo la membrana nuclear y finalmente entre los gránulos de cromatina presenta una vacuola, posteriormente estas espermatogonias se dividen mitóticamente y al dividirse, una de las células resultantes da origen a las espermatogonias A claras, las cuales presentan un núcleo ovoide mientras que la cromatina finamente granular se tiñe pálidamente con colorantes, al igual que la A oscura presenta un nucleolo excéntrico bajo la membrana nuclear, posteriormente la espermatogonia A clara se divide mitóticamente originando a las espermatogonias B, las cuales tienen forma esférica al igual que su núcleo presentando característicamente la cromatina en grumos, los cuales se encuentran bajo la membrana nuclear, y un nucleolo pequeño ubicado centralmente, estas células continúan con la espermatogénesis sufriendo la última división mitótica para dar origen al espermatocito de primer orden (**Fig. 3**). (Phillips *et al.*, 2010; Megías *et al.*, 2019).

La siguiente fase es la de crecimiento cuya finalidad es la reducción del número cromosómico de diploide ($2n$) a haploide (n) en el núcleo de los gametos, ocurriendo la meiosis (Fig. 3). De manera general, este proceso se inicia tras una replicación del DNA, conocida como fase S (células tetraploides o $4n$) generando cuatro células haploides (n) mediante dos procesos de división: meiosis I y meiosis II.

La fase más característica de la meiosis I es la profase I, durante la cual los cromosomas homólogos se unen mediante el complejo sinaptonemal y llevan a cabo la

recombinación meiótica (Gerton *et al.*, 2005). Esta a su vez se divide en cuatro etapas: leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno. Durante la fase de leptoteno la cromatina comienza a condensarse, en esta etapa también tiene lugar el alineamiento inicial entre cromosomas homólogos y la formación de los elementos axiales a partir de cohesinas y proteínas específicas que constituirán el llamado complejo sinaptonemal.

En el zigoteno la condensación de la cromatina continúa, los cromosomas homólogos siguen alineándose y se establece la unión de los elementos axiales mediante la aparición de un elemento central, constituido por la proteína *SYCP1*.

Este proceso está rigurosamente controlado y presenta poca variación entre los individuos, conocido como sinapsis cromosómica (Gerton *et al.*, 2005). Posteriormente, en la fase de paquiteno, todos los cromosomas homólogos han completado ya la sinapsis, recibiendo el nombre de bivalentes.

La última fase, la de diploteno, se produce una alta actividad metabólica alcanzando el grado de compactación máximo de la cromatina, también se transcribe información de tipo ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr) y ARN de transferencia (RNAt), la cual será utilizada en el proceso de espermiogénesis. Por último, los cromosomas homólogos se separan debido a la desorganización del complejo sinaptonemal y degradación de proteínas asociadas (entre ellas *SYCP1*) y quedan unidos únicamente por los quiasmas. Dicho lo anterior, los espermatocitos de primero orden, caracterizados por ser las células de mayor volumen, debido a la actividad metabólica que se llevó a cabo al final de la profase I, continúan con su división (metafase I, anafase I y telofase I) para dar origen a los espermatocitos de segundo orden.

En la fase de metafase I los pares de cromosomas homólogos formados por doble cromátide se alinean en la placa ecuatorial del huso acromático y se unen fibras del huso acromático a los cinetocoros de los cromosomas. En Anafase I, se da la separación de la placa ecuatorial y migración a polos opuestos de los cromosomas homólogos compuestos por doble cromátide, finalmente en la telofase I, los cromosomas llegan a los polos opuestos y termina la cariocinesis con la formación de las membranas nucleares (Gerton *et al.*, 2005).

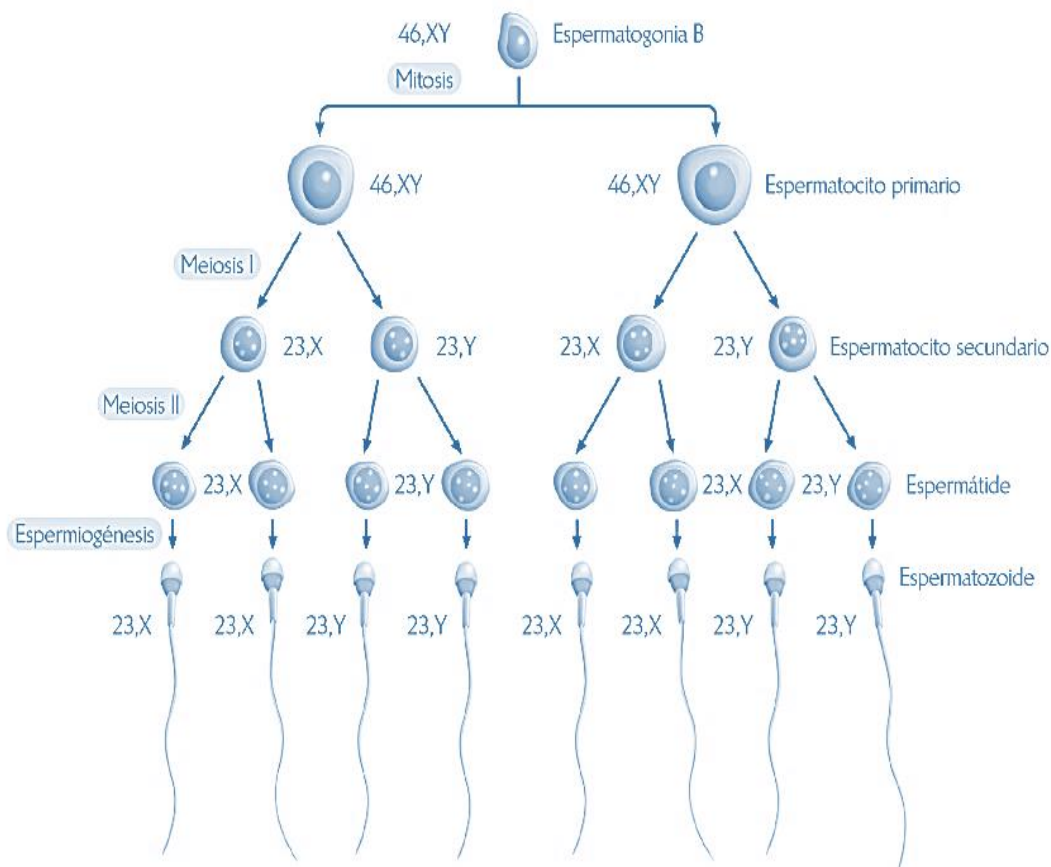


Figura 3. Proceso de la espermatogénesis desde la espermatogonia B hasta los espermatozoides. En el túbulo seminífero donde se lleva a cabo la espermatogénesis se pueden observar diferentes tipos celulares, en la base, espermatogonias que darán origen a espermatocitos primarios y estos a su vez a espermatocitos secundarios para dar origen a las espermátidas, finalmente a la luz del túbulo seminífero los espermatozoides. Se muestra el tipo de división celular y dotación cromosómica. Tomado de Arteaga & García, 2021.

En el varón, un circuito de retroalimentación negativa controla el eje hipotálamo-testículo; este circuito tiene dos vías. En la primera vía, la testosterona misma retorna al hipotálamo y la hipófisis debido a un incremento de testosterona, inhibiendo la secreción de GnRH y LH. En la segunda vía, debido a la ausencia de testosterona, incrementan los niveles de ABP, las células de Sertoli sintetizan una proteína denominada inhibina, que constituye el inhibidor de la secreción de FSH (Bustos & Torres., 2012 & Megías *et al.*, 2019).

1.6 Espermiogénesis

La espermiogénesis es la etapa final de la espermatogénesis, un mecanismo altamente conservado evolutivamente que dará origen a un espermatozoide maduro y funcional. Comprende cuatro fases distintas: la fase de Golgi, de casquete, la acrosomal y, finalmente, la de maduración (Zakrzewski *et al.*, 2021) (**Fig. 4**).

Durante la fase denominada de Golgi, el aparato de Golgi, que se encuentra junto al núcleo, se desprenden vesículas que se fusionan y poco a poco se unen para convertirse en la vesícula acrosomal que se localiza en la parte apical del núcleo y contiene el granulo acrosomal (**Fig. 4**). La vesícula acrosomal se adhiere a través de una placa citoesquelética llamada acroplaxoma a la envoltura nuclear, el cual consiste en filamentos de actina y la proteína de filamento intermedia, SAK57 (queratina asociada a células espermatogénicas / espermatozoides de masa molecular 57 kDa), que forma el anillo marginal que termina el acroplaxoma y conecta, junto con proteínas enlazadoras adicionales, el acrosoma a la lámina nuclear (Zakrzewski *et al.*, 2021). Posteriormente, en la fase de casquete; el núcleo empieza a ser rodeado por la vesícula acrosómica, el núcleo se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas (**Fig. 4**). Mientras que en la fase acrosomal la espermatida gira 180° de la membrana basal; se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia

la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media (Zakrzewski *et al.*, 2021).

Finalmente, en la fase de maduración se produce el alargamiento de las espermátidas se elimina el cuerpo residual observándose las características finales de los espermatozoides: forma de la cabeza característica de cada especie, cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma; y la cola compuesta por las piezas media, principal y terminal (**Fig. 4**) (Zakrzewski *et al.*, 2021).

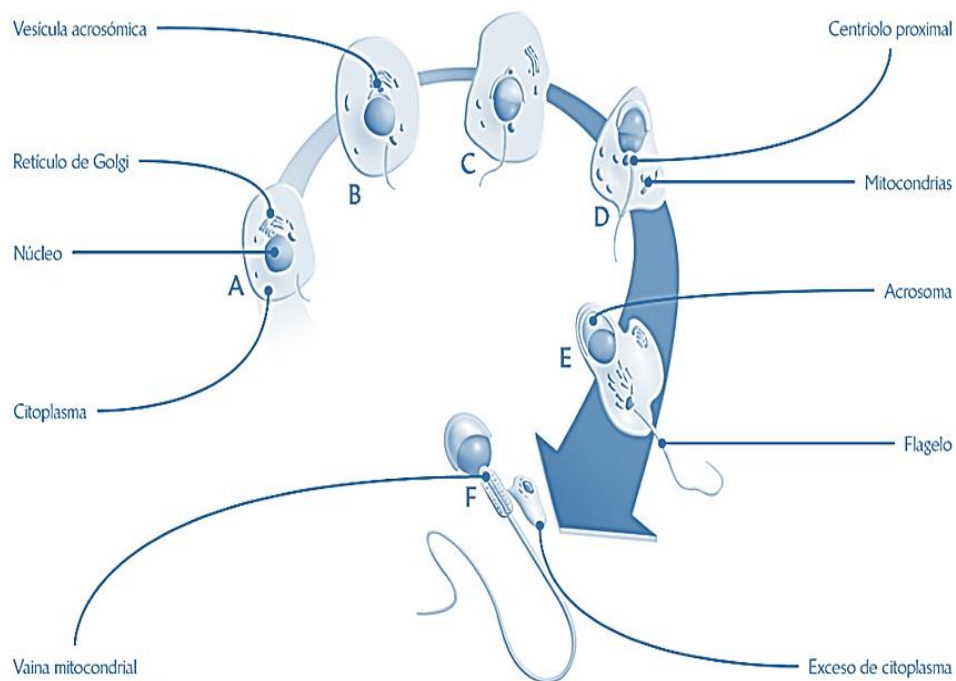


Figura 4. Diagrama de las principales etapas de la espermiogénesis. **A.** Una espermatogonia inicia el proceso mostrando su núcleo, retículo de Golgi y algunas mitocondrias. **B.** A partir del retículo de Golgi se forma la vesícula acrosómica en la vecindad del núcleo y empieza a constituirse el flagelo a partir de los centriolos. **C.** Se ha conformado ya el acrosoma; las mitocondrias comienzan a migrar hacia donde se está formando el flagelo. **D.** El núcleo y su acrosoma se han ubicado en el polo opuesto a donde está el flagelo y casi todo el citoplasma y sus organelos están quedando desplazados hacia el polo del flagelo. **E.** Se ha iniciado la eliminación del exceso de citoplasma y las mitocondrias están rodeando la porción inicial del flagelo. **F.** Esta célula se ha transformado ya en un espermatozoide, se ha formado la vaina mitocondrial y se ha eliminado casi todo el citoplasma. Tomado de Arteaga & García, 2021

1.7 Espermatozoide

La palabra espermatozoide proviene del griego “*sperein*” que significa “sembrar” ya que la fertilidad se ha asociado con la tierra y con los frutos que esta produce desde la antigüedad (Ballesca *et al.*, 2019). En términos biológicos, se puede definir como una célula altamente especializada capaz de desplazarse por el tracto reproductor femenino y cuya función principal es la de proteger y entregar el genoma paterno al ovocito y fertilizarlo para la generación de un nuevo ser vivo (Lara *et al.*, 2021).

En general, la estructura de los espermatozoides está altamente conservada en todos los animales, aunque existen excepciones. En términos generales, su diseño consiste en una cabeza, un cuello (pieza media) y un flagelo (o cola) (**Fig. 5**).

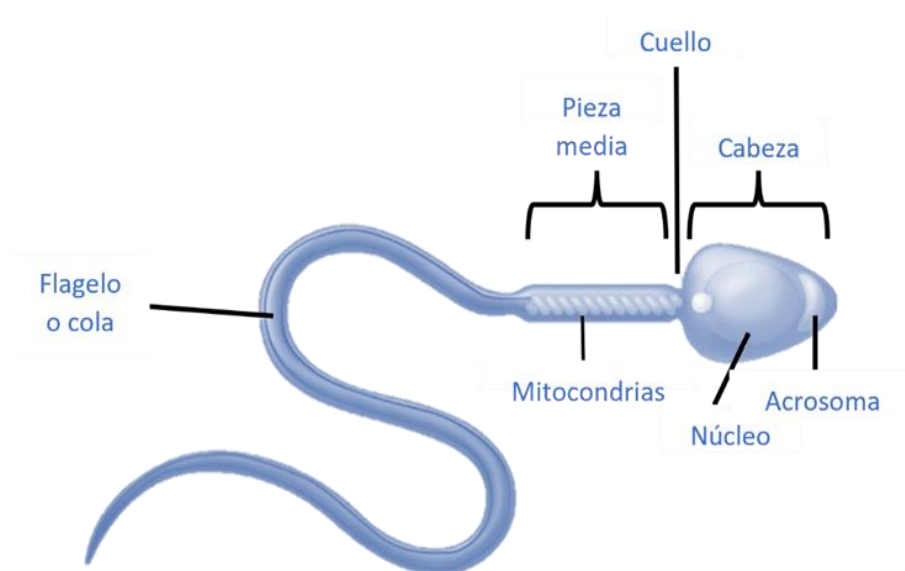


Figura 5. Esquema que muestra las partes estructurales del espermatozoide: cabeza, pieza media y un flagelo. La cabeza, está formada fundamentalmente por el núcleo, está cubierta en su totalidad por el acrosoma. Las mitocondrias concentradas en la porción proximal del flagelo forman la vaina mitocondrial y el flagelo dividido en pieza intermedia, piezas principal y final (Elaboración propia).

La cabeza del espermatozoide posee el núcleo, un cuello, o pieza de conexión, que une la cabeza del espermatozoide al flagelo y contiene centriolos típicos o atípicos. Y, por último, el flagelo, que consiste en la pieza intermedia y las piezas principal y final. Además, contiene la maquinaria necesaria para producir energía en forma de ATP (Adenosín Trifosfato) lo que le permite su motilidad (Malo *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, la cabeza del espermatozoide contiene un núcleo haploide con cromatina muy compactada que contiene la información genética y un acrosoma, un gránulo exocítico con enzimas que se liberan para ayudar al espermatozoide a penetrar el ovocito durante la fertilización. Las regiones extranucleares y acrosomales se pueden identificar en las cabezas de los espermatozoides. Además, existe un espacio citoplasmático definido por el acrosoma, el núcleo y las membranas plasmáticas (Teves & Roldan, 2022). El flagelo se adhiere a la cabeza del espermatozoide a través del cuello (o pieza de conexión), que incluye centriolos proximales y distales típicos o atípicos. El flagelo tiene tres regiones reconocibles: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. La pieza intermedia tiene el cuello como límite anterior y el anillo, que es un anillo transversal de material denso, como límite posterior. La pieza intermedia contiene mitocondrias que generan ATP a través de la fosforilación oxidativa, mientras que la pieza principal puede generar ATP a través de la glucólisis (Teves & Roldan, 2022).

Finalmente, es importante señalar que los espermatozoides son células altamente polarizadas y diferenciadas, mientras que su capacidad de reparación es muy limitada, por lo que es susceptible a diversos factores, principalmente mecanismos testiculares (maduración defectuosa y apoptosis abortiva) y posttesticulares (estrés oxidativo) pero, también se incluyen otros factores como infecciones, tabaquismo, drogadicción, exposición a

contaminantes ambientales y laborales, envejecimiento, varicocele, fiebre alta, aumento de la temperatura de los testículos, entre otros, lo que provoca daños a la cromatina y a la membrana del espermatozoide (Agarwal *et al.*, 2020; Sadeghi, 2021; Teves & Roldan, 2022).

1.8 Análisis seminal

El análisis seminal o espermograma es la prueba diagnóstica más utilizada para la evaluación de los parámetros del semen (Campos *et al.*, 2021). Se basa actualmente en los estándares definidos en el manual de laboratorio para el examen y procesamiento del semen humano creado por la OMS, desde la 1ª edición del manual de laboratorio publicado en 1980 hasta la actual en 2021 la 6ª edición, en los cuales se han producido avances significativos con la incorporación de desarrollos recientes en técnicas de examen de semen, métodos de preparación y criopreservación de espermatozoides, nuevas tecnologías para mejorar el control y la garantía de calidad, los recientes avances científicos en la comprensión de la SDF, el SG y las pruebas de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) pues han arrojado luz adicional sobre el pronóstico de los resultados reproductivos en términos de concepción natural y tecnología de reproducción asistida (Boitrelle *et al.*, 2021).

Por otro lado, se considera que los hombres con parámetros seminales por debajo de los valores normales de la OMS tienen infertilidad por factor masculino y la calidad del semen se utiliza como una medida sustituta de la fecundidad masculina, sin embargo, el análisis de semen es descriptivo y no un marcador directo de la función de los espermatozoides, y su valor predictivo para la concepción natural y las tasas de fertilidad son bajas en la mayoría de los entornos (Sharma *et al.*, 2021). Otros autores coinciden con lo anterior, pues consideran que el espermograma no determina el potencial fertilizante de los

espermatozoides y los cambios complejos que ocurren en el tracto reproductivo femenino antes de la fertilización . Por lo tanto, puede haber otros factores que afecten a la fertilidad masculina y no sean detectados por el espermograma, por ejemplo: defectos de la membrana espermática, factores ambientales, factores genéticos y SDF (Campos *et al.*, 2021). En la **Tabla 1**, se puede observar los cambios de los parámetros seminales del reciente manual (6ª edición) para la examinación y procesamiento del semen humano. Por lo tanto, los valores de referencia "normales" de la 5ª edición han sido reemplazados por "límites de decisión" en la 6ª edición (Kandil *et al.*, 2021).

Tabla 1. Parámetros seminales según la OMS 2021 (6ª edición).

Parámetros	OMS 2021
Volumen de semen (mL)	1.4 (1.3-1.5)
Número total de espermatozoides (10 ⁶ por eyaculación)	39 (35-40)
Motilidad total (%)	42 (40-43)
Motilidad progresiva (%)	30 (29-31)
Motilidad no progresiva (%)	1 (1-1)
Espermatozoides inmóviles (%)	20 (19-20)
Vitalidad (%)	54 (50-56)
Formas normales (%)	4 (3.9-4)

Tomado de World Health Organization. (2021).

1.9 Infertilidad masculina

La infertilidad es la incapacidad de una pareja para lograr un embarazo después de 12 meses de relaciones sexuales sin protección (Sharma *et al.*, 2021). En los últimos años, se ha observado que cada vez más hombres sufren de fertilidad reducida (parámetros de la calidad seminal disminuida) y a la vez se ha observado que el potencial reproductivo de la población masculina mundial está disminuyendo constantemente y no hay tendencia a la mejora (Chereshnev *et al.*, 2021).

La etiología de la infertilidad masculina sigue siendo tema de debate entre diversos expertos, pero se advierte la influencia de factores exógenos y endógenos, así como efectos negativos sobre la espermatogénesis (defectos de maduración, apoptosis abortiva) y las diferentes etapas de la fertilización (**Fig. 6**) (Chereshnev *et al.*, 2021). Muchos factores genéticos y de estilo de vida se han implicado en la infertilidad masculina; sin embargo, alrededor del 30% de los casos todavía se cree que son idiopáticos (Fainberg & Kashanian, 2019). Los estudios muestran que la incidencia de infertilidad en parejas en edad reproductiva es aproximadamente del 8% al 15%, de los cuales alrededor del 50% son causados por factores masculinos (Li *et al.*, 2022).

La infertilidad masculina tiene una variedad de causas, que van desde mutaciones genéticas hasta opciones de estilo de vida (Fainberg & Kashanian, 2019). Estudios mundiales han demostrado que el aumento de la infertilidad en los últimos años también podría deberse a factores anatómicos y fisiológicos. Muchas condiciones ambientales y factores adquiridos, como el tabaquismo y el consumo de alcohol, los cambios en el comportamiento sexual y la dieta también influyen en la fertilidad y la calidad del semen, y por lo tanto pueden conducir a la diversidad en la etiología y los patrones de infertilidad en diferentes regiones (**Fig. 6**)

(Jafari *et al.*, 2021). Otros autores han observado que la exposición a toxinas ambientales en dosis bajas puede afectar la espermatogénesis (Krzastek *et al.*, 2020). Además, se ha reportado que la integridad del ADN de los espermatozoides es otro factor que puede verse afectado en sujetos obesos, posiblemente como resultado de un mayor daño debido al SG (Dupont *et al.*, 2013).

Por otro lado, los recientes avances en la fragmentación, capacitación y nanotecnología del ADN de los espermatozoides han arrojado luz sobre estas enigmáticas causas de la infertilidad en el varón. En cuanto a los avances de la SDF se ha avanzado en técnicas que permiten identificar espermatozoides viables con índices bajos de SDF como la clasificación de espermatozoides con activación magnética, citometría de flujo y microfluidos y en la capacitación se utilizan el Cap-Score™, una prueba en investigación que mide el potencial de capacitación de los espermatozoides entre otras pruebas diagnósticas, como MiOXSYS, que mide el SG (Fainberg & Kashanian, 2019).

Se ha observado que los hombres con problemas reproductivos, desde una perspectiva psicológica y social, perciben la infertilidad como un fracaso de la virilidad, un proceso plagado de estigma, silencio y represión, además de tener un efecto devastador en sus vidas (Pakpahan *et al.*, 2023). Comúnmente se encuentran sentimientos de vulnerabilidad, aislamiento, fracaso e inutilidad. En algunas comunidades, es innegable que la infertilidad tiene un impacto significativo en el creciente número de casos de divorcio, dificultades económicas entre otras. El concepto tradicional de masculinidad sostiene que un hombre debe ser fuerte, no mostrar muchas emociones y debe ser independiente y dominante. De este modo, la virilidad significa que un hombre puede dejar embarazada a una mujer y funcionar sexualmente (Pakpahan *et al.*, 2023). Por el contrario, un varón que no cumple con estas

características limita su crecimiento personal, causa angustia por no cumplir con esos criterios, lo que puede conducir depresión, consumo de sustancias e incluso el suicidio (Pakpahan *et al.*, 2023).

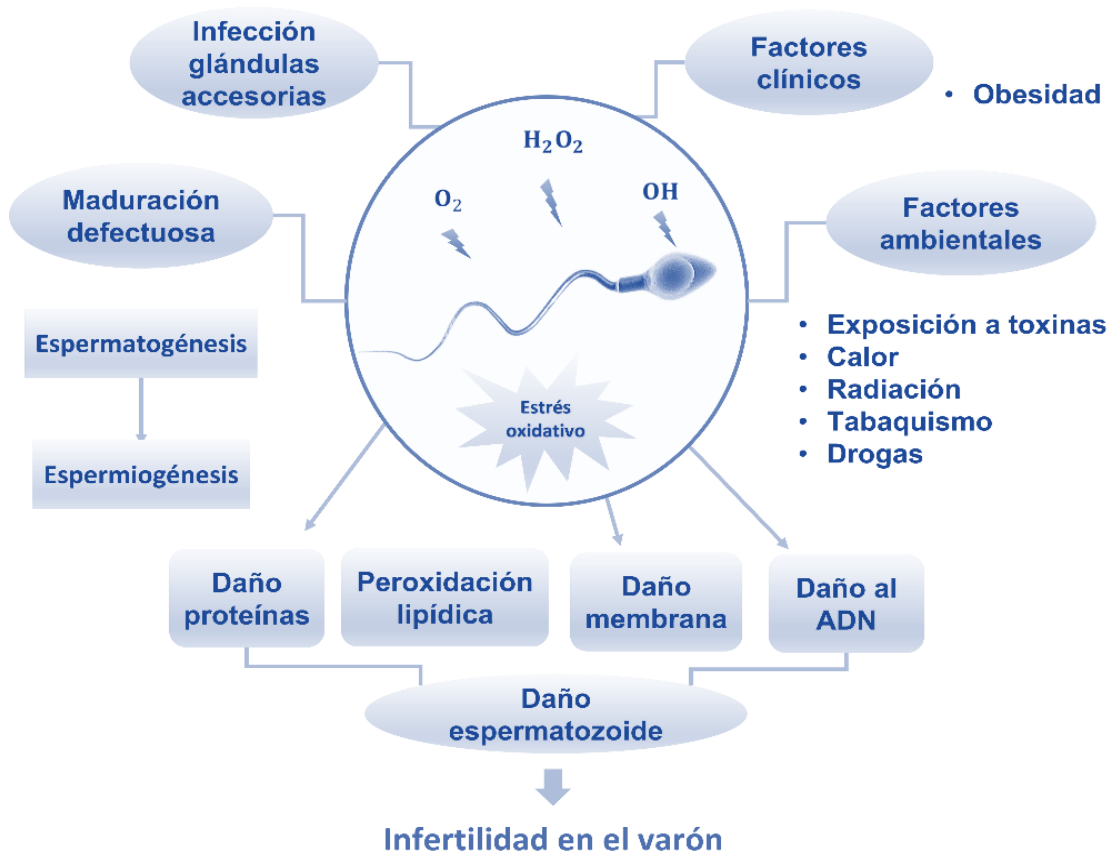


Figura 6. Esquema que muestra los factores intrínsecos y extrínsecos que producen infertilidad en el varón (Elaboración propia).

2. Fragmentación del ADN de los espermatozoides

La SDF puede estar asociada con factores intrínsecos (intratesticulares) y extrínsecos (postestriculares). intrínsecamente, dichos factores pueden incluir defectos en la maduración de las células germinales, apoptosis abortiva y SG, mientras que extrínsecamente, los factores del estilo de vida (es decir, fumar, exposición al calor, etc.), los medicamentos, los contaminantes ambientales y más pueden contribuir al daño del ADN. Independientemente

de los factores involucrados en la inducción de SDF, este daño impacta a nivel celular a través de al menos uno de los tres mecanismos propuestos: falla de la apoptosis, alteración de la maduración de la cromatina y/o ataque oxidativo (Marinero *et al.*, 2023).

Los espermatozoides generalmente están protegidos del daño del ADN por la rigurosa compactación del ADN que resulta del reemplazo de las proteínas histonas somáticas por protaminas. Este proceso es facilitado por las enzimas topoisomerasas, que crean rupturas en el ADN para reducir el estrés torsional y permitir que las protaminas desplacen a las histonas. Si estas rupturas no se corrigen, una interrupción en el empaquetamiento de la cromatina puede provocar una maduración deficiente del espermatozoide y rupturas permanentes del ADN (Marinero *et al.*, 2023).

2.1 Tipos de fragmentación del ADN de los espermatozoides

La SDF puede ser de dos tipos: roturas monocatenarias (SSB; del inglés single strand breaks) y roturas de doble cadena (DSB; del inglés double strand breaks) (Farkouh *et al.*, 2022). Existe evidencia que demuestra que las DSB están asociados con el aborto espontáneo recurrente en una pareja sin factor femenino. Por otro lado, otros estudios han señalado que las SSB no tienen un impacto significativo en el desarrollo embrionario o las tasas de implantación. Aunque las SSB y las DSB pueden tener diferentes implicaciones sobre los resultados reproductivos, así como diferentes mecanismos moleculares subyacentes, vale la pena señalar que la mayoría de los estudios que investigan el efecto de las SDF sobre la infertilidad masculina y los resultados reproductivos deficientes no distinguen entre los diferentes tipos de roturas (Tímermans *et al.*, 2020; Farkouh *et al.*, 2022).

3. Estrés oxidante

Uno de los factores de riesgo de SDF es el SG, el cual se caracteriza por un desequilibrio de ROS y defensas antioxidantes y se cree que es una de las causas de infertilidad masculina idiopática. Las ROS, por otro lado, son radicales libres derivados del oxígeno con electrones desapareados que los hace altamente reactivos, e incluyen aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, peroxilo e hidroxilo. Varias pueden ser las fuentes de ROS en el semen, tanto endógenas como exógenas (Traini *et al.*, 2022). En los espermatozoides los leucocitos son las principales fuentes endógenas de ROS, es común en pacientes con infecciones de las glándulas sexuales accesorias, ya que se ha demostrado que la activación de los leucocitos, principalmente neutrófilos, es un paso importante en la producción de citoquinas y ROS. El peróxido de hidrógeno, el anión superóxido, así como los nitratos y nitritos, son producidos por macrófagos y granulocitos activados y son altamente tóxicos para los espermatozoides (Arata *et al.*, 2005).

En cuanto a las fuentes de producción exógenas de ROS incluyen estilos de vida poco saludables, el tabaquismo, el consumo de alcohol, las radiaciones, las condiciones patológicas y los contaminantes ambientales (Traini *et al.*, 2022). Por ejemplo, la radiación de los teléfonos móviles puede causar ROS en los espermatozoides humanos, afectando la calidad del semen induciendo daños en el ADN espermático, lo que afecta la concentración, la motilidad y la vitalidad de los espermatozoides (Dutta *et al.*, 2019). Las ondas electromagnéticas de radiofrecuencia alteran el flujo de electrones intracelulares a través de la membrana interna, interfiriendo así con la función normal de las células germinales, por otro lado otros autores señalan que los ftalatos (en plásticos), así como metales como el cadmio, el cromo, el plomo, el manganeso y el mercurio pueden afectar la espermatogénesis,

la calidad y el recuento de espermatozoides, también se señala que el alcohol contribuye a la producción de ROS y también puede afectar los mecanismos de defensa antioxidantes (Dutta *et al.*, 2019). El acetaldehído, un subproducto del metabolismo del etanol, puede generar ROS al interactuar con proteínas y lípidos, dañando así los componentes celulares y reduciendo el porcentaje normal de espermatozoides. Al igual que fumar provoca un desequilibrio entre ROS y antioxidantes en el semen de los fumadores, pues se ha observado que fumar puede aumentar las concentraciones de leucocitos seminales en un 48% y los niveles de ROS seminales en un 107% (Dutta *et al.*, 2019).

En pequeñas cantidades fisiológicas, las ROS son necesarias para la hiperactivación, capacitación y la reacción acrosómica de los espermatozoides. Sin embargo, la producción excesiva de ROS, que excede la capacidad de eliminación de fluidos seminales, causa SG. Como resultado, las ROS dañan las membranas, las proteínas y el ADN, lo que resulta en un deterioro de las funciones de los espermatozoides. En particular, a nivel de ADN, las ROS pueden producir oxidación de bases, mutaciones y fragmentación (Calogero *et al.*, 2023; Traini *et al.*, 2022).

3.1 Técnicas para la evaluación de la fragmentación del ADN de los espermatozoides

Existen diferentes métodos disponibles para medir SDF, incluido el ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA; del inglés sperm chromatin structure assay), el marcado terminal de desoxinucleotidiltransferasa dUTP (TUNEL, del inglés terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), la dispersión de cromatina espermática (SCD; del inglés sperm chromatin dispersion test) y el ensayo de electroforesis en gel unicelular (COMETA; del inglés single cell gel electrophoresis assay) tienen

protocolos estandarizados y representan las pruebas más utilizadas en la práctica clínica (Calogero *et al.*, 2023).

La técnica SCSA analiza la sensibilidad del ADN espermático a la desnaturalización cuando se expone al calor o al ácido, mientras que la prueba TUNEL utiliza nucleótidos fluorescentes para identificar "muescas" de ADN. El ensayo COMETA utiliza electroforesis neutra y alcalina para evaluar múltiples patrones de daño en el ADN en cada célula y, finalmente, el ensayo SCD (también conocida como prueba de halo) se basa en el principio de que los espermatozoides con SDF no producen el halo característico de los bucles de ADN dispersos que se observan en los espermatozoides con ADN no fragmentado (Esteves *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2023).

3.1.1 Ensayo de la dispersión de la cromatina espermática

Un método simple, económico y sensible utilizado para detectar daños en el ADN de los espermatozoides es la prueba SCD, este ensayo se utiliza para evaluar los diferentes niveles de fragmentación del ADN mediante un tampón de lisis que descompone las bandas de disulfuro y sale de las proteínas (Pourmasumi *et al.*, 2019a).

En los espermatozoides con ADN no fragmentado, se libera el bucle de ADN, formando un gran halo alrededor de la estructura central del núcleo. Sin embargo, los espermatozoides con ADN fragmentado tienen un halo pequeño o está ausente. El tamaño del halo se puede observar mediante microscopía de luz o de fluorescencia, según el tipo de color (wright o fluorescente) (Pourmasumi *et al.*, 2019a). La prueba SCD para predecir el grado de fragmentación del ADN tiene un valor predictivo similar al de TUNEL y SCSA.

Por lo tanto, como método relativamente más simple, el método SCD puede ser una buena alternativa al método SCSA (Pourmasumi *et al.*, 2019a).

El principio de este ensayo es que después de la desnaturalización ácida, la estructura de la cromatina del espermatozoide se afloja, lo que permite que el anillo de ADN se adhiera a la estructura nuclear residual, formando un halo característico. Los espermatozoides con integridad de ADN deteriorado no forman este halo característico. Por lo tanto, la integridad del ADN del espermatozoide se puede juzgar por la presencia o ausencia del halo bajo el microscopio (Qiu *et al.*, 2020).

3.2 Cromatina espermática

La integridad del ADN espermático es crucial para la fertilización y el desarrollo de una descendencia saludable (Zhu *et al.*, 2022). Los espermatozoides están especializados en transmitir información genómica a la siguiente generación. Por otro lado, la cromatina está altamente condensada para asegurar la motilidad necesaria para la fertilización y para proteger físicamente el ADN genómico (Okada, 2022).

La compactación nuclear del espermatozoide se logra a través del proceso conocido como transición de núcleo-histona a núcleo-protamina (NH-NP), que ocurre durante la espermiogénesis (de la Iglesia *et al.*, 2023). En este proceso, protaminas (PRM, del inglés protamine) pequeñas y extremadamente básicas reemplazan a la mayoría de las histonas y forman estructuras toroidales y similares a varillas altamente empaquetadas que pueden condensar el ADN hasta 250 veces más que un nucleosoma (de la Iglesia *et al.*, 2023).

La PRM es una pequeña proteína rica en arginina que puede unirse al surco principal del ADN y que es responsable de la condensación de la cromatina espermática. En

los mamíferos, las PRM se expresa específicamente en las células germinales haploides masculinas y reemplaza a las histonas, lo que da como resultado que solo el 10 % de las histonas permanezcan en el espermatozoide maduro (Okada, 2022).

3.2.1 Compactación nuclear del espermatozoide

La compactación nuclear de los espermatozoides es un factor determinante, ya que está directamente relacionada con el volumen de la cabeza del espermatozoide y, por lo tanto, con la velocidad óptima de esta célula, importante de una fertilización exitosa (Champroux *et al.*, 2016).

Para lograr este objetivo, la cromatina se condensa fuertemente desde la periferia hacia el centro y desde el vértice hasta la base del núcleo. La condensación de la cromatina ocurre debido a una profunda reorganización de las proteínas asociadas al ADN. Primero, se requieren varias modificaciones de histonas y la incorporación de variantes de histonas (particularmente las variantes de histonas enlazadoras: H1t, H1t2 y Hils) para abrir la cromatina y permitir el intercambio de histonas con Tnp. Luego, Tnp se reemplaza por otras proteínas básicas, las PRM. Entre las histonas PTM registradas durante la espermiogénesis, la hiperacetilación y la ubiquitinación ocurren simultáneamente y parecen desempeñar un papel importante en el intercambio de las histonas-protaminas (Champroux *et al.*, 2016).

3.2.2 Proteínas de transición

Las proteínas de transición (Tnps; del inglés transition nuclear proteins) son proteínas pequeñas (50 a 140 residuos), más básicas que las histonas (pero menos básicas que la protamina) y ricas en arginina y lisina. Se conocen cuatro Tnps en mamíferos, pero solo se han estudiado bien Tnp1 y Tnp2 (Champroux *et al.*, 2016). Tnp1 y Tnp2 están

codificados por dos genes diferentes de una sola copia que consisten en dos exones y un intrón. En roedores y humanos, el gen *tnp2* forma parte de una familia génica junto con los genes *prm1*, *prm2* y *prm3*. Esta familia está rodeada por dos regiones de unión a matriz (MAR) y está involucrado en la regulación transcripcional de estos genes durante la espermiogénesis. La transcripción de estos genes agrupados y *tnp1*, ubicado en otro cromosoma, ocurre simultáneamente en las espermátidas redondas (Champroux *et al.*, 2016).

Las proteínas de transición están presentes en muchas especies, incluyendo ratones, ratas, humanos, carneros y jabalíes (Moritz & Hammoud, 2022). El proceso implica la descomposición y posterior reparación del ADN de doble cadena para facilitar el reemplazo de histonas hiperacetiladas específicas de testículos en las espermátidas redondas por Tnps seguidas de un reemplazo ordenado de dos tipos de protaminas fosforiladas (Tnp1 y Tnp2) en la etapa de espermátida alargada. El nuevo empaque de cromatina de alto orden da como resultado una interrupción global de la transcripción en los espermatozoides (Colaco & Sakkas, 2018).

Las protaminas son de tamaño medio de las histonas y la mayoría de los aminoácidos en las protaminas son arginina (Küçük, 2018). P1 se expresa en su forma madura, mientras que P2 se expresa inicialmente como un precursor más largo (pro-P2) y se somete a un procesamiento proteolítico selectivo para producir su forma madura (P2) una vez unida al ADN. El truncamiento del extremo amino de P2, la porción de la proteína que normalmente se escinde (*cP2*) en el núcleo, causa infertilidad debido a la importación ineficiente de la proteína en el núcleo, lo que resulta en proporciones alteradas de protamina y espermatozoides inmóviles; lo que sugiere que la isoforma más larga puede ser necesaria para las interacciones protamina-chaperona (Moritz & Hammoud, 2022).

3.3 Tinción azul de anilina (AB)

Esta tinción fue establecida por Terquem y Dadoune. Demostraron que la tinción azul de anilina (AB del inglés; aniline blue) era ácida, mostrando específicamente la presencia de histonas adicionales en la estructura de la cromatina espermática. La tinción AB distingue histonas ricas en lisina y protaminas ricas en arginina/cisteína. Este método proporciona una reacción positiva específica para la lisina y revela diferencias en la composición de las principales proteínas nucleares del espermatozoide humano (Pourmasumi *et al.*, 2019a).

El AB reacciona con los aminoácidos de la lisina y, bajo un microscopio óptico, los núcleos de los espermatozoides con un alto contenido de histonas se observan de color azul. Los espermatozoides cuya cromatina se tiñe de azul con este color tienen un defecto en la transposición de histonas por protamina en la etapa de espermatogénesis. En otras palabras, la tinción AB muestra indirectamente la presencia de bajos niveles de protaminas en el núcleo espermático, es decir, que estos espermatozoides son inmaduros con baja densidad de cromatina (Pourmasumi *et al.*, 2019a).

3.4 Tinción azul de toluidina (TB)

La tinción azul de toluidina (TB; del inglés toluidine blue) es un colorante nuclear básico utilizado para la tinción metacromática de la cromatina. Los residuos de fosfato del ADN en los espermatozoides en núcleos con cromatina poco empaquetada o ADN alterado se unen al colorante TB y provocan un cambio metacromático debido a la dimerización de las moléculas del colorante de azul claro a violeta-púrpura (Pourmasumi *et al.*, 2019a).

La cromatina de baja densidad y anormal debido a la disponibilidad de grupos fosfato en el ADN tiene una gran afinidad por el colorante TB y este color está asociado con el ADN por un mecanismo externo. Cuantas más anomalías en la cromatina haya, más grupos fosfato estarán disponibles y aumentará el nivel de tinción del ADN. Así, se puede ver un espectro de azul claro (espermatozoides con cromatina normal), azul oscuro (espermatozoides con algo de cromatina anormal), violeta (espermatozoides con cromatina anormal) y finalmente púrpura (espermatozoides con cromatina severamente anormal) (Pourmasumi *et al.*, 2019a).

II. Antecedentes

Patel, Leong y Ramasamy en 2017, realizaron una revisión sistemática en la que analizaron una predicción de la infertilidad masculina por el manual de laboratorio para la evaluación del análisis de semen de la OMS, 2010. Estos autores utilizaron los “Elementos de notificación preferidos para revisiones sistemáticas y metaanálisis” o pautas PRISMA (del inglés *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*) para buscar artículos en las bases de datos MEDLINE, EMBASE y Cochrane donde se analiza la efectividad de los métodos de análisis de semen. Sus resultados revelan limitaciones que afectan la confiabilidad del análisis del semen como predictor de la fertilidad. Estos incluyen: la falta de consideración del factor femenino, umbrales vagamente definidos y diferencias individuales en los parámetros del semen. Concluyeron que los parámetros seminales por si solos no pueden predecir la infertilidad masculina, excepto cuando un varón tiene azoospermia, necrozoospermia o globozoospermia (Patel & Ramasamy, 2017).

Javed, Talkad y Ramaiah, en 2019, evaluaron la SDF utilizando múltiples métodos (TUNEL, SCSA, SCD y la prueba cometa, tanto neutro como alcalino) en muestras de semen fresco de 50 hombres fértiles y 50 infértiles. Los resultados mostraron que el punto de corte proyectado para el índice de fragmentación del ADN (DFI; del inglés DNA fragmentation index) fue del 22.08% utilizando el ensayo TUNEL, el 19,90% utilizando SCSA, el 24,74% utilizando la prueba SCD, el 48,47% utilizando la prueba de cometa alcalino y el 36,37% utilizando la prueba de cometa neutro. Asimismo, los resultados de la prueba de cometas alcalinos mostraron correlaciones significativas con las de las pruebas SCD, SCSA y TUNEL ($r = 0.59$, $r = 0.57$ y $r = 0.72$, respectivamente; $p < 0,001$). Concluyen que los ensayos TUNEL, SCSA, SCD y la prueba de cometa alcalino fueron efectivos para distinguir entre pacientes fértiles e infértiles, mientras que la prueba de cometa alcalino fue el mejor predictor de infertilidad masculina (Javed *et al.*, 2019).

Pourmasumi, Nazari, Fagheirelahee y Sabeti, en 2019, evaluaron la integridad de la cromatina espermática a través de pruebas citoquímicas, empleando tinciones con AB y TB, en hombres infértiles (1044 pacientes) y normozoospermicos (342 pacientes). Los resultados mostraron que la tinción con TB fue significativamente mayor en el grupo infértil en comparación con el grupo normozoospermico ($p = 0,005$), lo que significa que hay menor integridad de la cromatina. La media de morfología normal de los espermatozoides fue menor en los hombres con infertilidad idiopática en comparación con los hombres normozoospermicos ($p = 0,001$). La mayor correlación negativa se obtuvo entre el recuento de espermatozoides y la tinción AB. La motilidad progresiva se correlacionó negativamente con la tinción AB y TB en ambos grupos, pero no hubo diferencias significativas entre la tinción AB y la motilidad progresiva en el grupo de normozoospermicos masculina.

Concluyendo que la tinción de la cromatina espermática con AB y TB mostró una asociación negativa entre la condensación de la cromatina espermática con el recuento de espermatozoides, la morfología normal y la motilidad progresiva, sugiriendo que la prueba AB y TB pueden ser útiles para la evaluación del potencial de fertilidad masculina (Pourmasumi *et al.*, 2019b).

Qiu, Yang, Li y Xu, en 2020, mostraron en su investigación los avances sobre la fragmentación del ADN espermático, en el cual se menciona que la prueba más utilizada para determinar el potencial de la fertilidad masculina es a través del análisis seminal y que las pruebas de la SDF se encuentran en etapas de exploración preliminar. Sin embargo, investigaciones anteriores han demostrado que la SDF tiene un valor predictivo en el campo de la ART (Qiu *et al.*, 2020). Los autores señalan también trabajos que han permitido comprender más acerca de los mecanismos de la SDF en los que también intervienen factores ambientales como el de Evenson & Wixon (2005), en el que evaluaron tóxicos ambientales (contaminación atmosférica) durante 2 años, demostrando que en hombres jóvenes en el que rociaron plaguicidas sin equipo de protección presentaban mayor riesgo de SDF elevada (Evenson & Wixon, 2005).

Por otro lado, Pino y colaboradores, en 2020, vieron los efectos del envejecimiento sobre los parámetros del semen y la fragmentación del ADN espermático realizaron un estudio descriptivo retrospectivo en el que analizaron los datos de las historias clínicas de pacientes de 18 años o más sometidos a análisis de semen en el Laboratorio de Andrología de la Clínica las Condes en Santiago, Chile, entre enero de 2014 y mayo de 2017 y evaluaron las posibles correlaciones entre la edad masculina y diferentes parámetros espermáticos derivados del análisis de semen y la SDF de los espermatozoides. Sus resultados mostraron

que los varones mayores de 50 años fueron significativamente más propensos a presentar anomalías en el volumen de semen, la concentración de espermatozoides y la SDF. Lo que demuestra que la edad masculina afecta significativamente los parámetros del semen y que podrían tener un impacto en la fertilidad masculina. Ahora bien, los resultados de SDF mostraron que los varones mayores de 50 años presentaban un aumento estadísticamente significativo en el daño del ADN y tuvieron 4.58 veces más probabilidades de presentar fragmentación del ADN espermático que los hombres de 21 a 30 años (Pino *et al.*, 2020).

Riffat y colaboradores, en 2023, en su trabajo analizaron los parámetros del semen, la integridad de la cromatina espermática, los niveles de enzimas antioxidantes y los niveles de hormonas reproductivas de 750 hombres subfértiles de Pakistán, en relación con su edad. Se contó con tres grupos experimentales según su edad: el grupo 1 incluyó hombres de 30 años o menos ($n = 90$), el grupo 2 incluyó hombres entre las edades de 31 y 40 años ($n = 330$), y el grupo 3 incluyó hombres mayores de 40 años ($n = 330$). Los resultados mostraron que los parámetros convencionales del semen, las especies reactivas de oxígeno (ROS), el superóxido dismutasa (SOD, del inglés superoxide dismutase), la guayacol peroxidasa (GPX; del inglés guaiacol peroxidase), la catalasa (CAT; del inglés catalase) y la peroxidación lipídica no difirieron estadísticamente ($p > 0,05$) con el aumento de la edad masculina o entre diferentes grupos de edad. Interesantemente, los hombres con edad avanzada se asociaron con una calidad de espermatozoides deteriorada, así como la integridad de la cromatina, pues presentaron niveles significativamente más altos de inmadurez de la cromatina espermática en comparación con los hombres más jóvenes (<30 años), el ensayo SCD fue significativamente menor ($23,2 \pm 0,88\%$) ($p = 0,01$) en comparación con los pacientes masculinos de >40 años ($26,6 \pm 0,6\%$). también se observó un aumento significativo ($p =$

0,04) en la inmadurez de la cromatina espermática CMA3+ ($30 \pm 0,71\%$) en el grupo de edad avanzada (>40 años) en comparación con el grupo de <30 años ($26,6 \pm 1,03\%$). Concluyendo que la edad masculina es uno de los factores que contribuyen a la disminución de la fertilidad masculina (Riffat *et al.*, 2023).

Finalmente, Okubo y colaboradores, en 2023, evaluaron el DFI y los parámetros del semen según los criterios de la OMS, 2010 y compararon las dos pruebas. El estudio incluyó a un total de 182 pacientes, además, examinaron si el DFI era un parámetro fiable asociado con los resultados de la fertilización *in vitro* (FIV). Los resultados mostraron que los hombres presentaban un DFI media de espermatozoides de $15,3\% \pm 12,6\%$, observándose que el DFI aumentó con la edad. Por el contrario, la motilidad y la morfología normal disminuyeron a medida que aumentaba el DFI. En consecuencia, el DFI alto ($\geq 30\%$) causó una baja tasa de desarrollo de blastocisto después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), sugiriendo que la prueba de SCD puede evaluar con mayor precisión la correlación entre los resultados clínicos de FIV y la infertilidad masculina. Por lo tanto, se sugiere la importancia de centrarse en las mediciones del DFI para determinar la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Okubo *et al.*, 2023).

III. Justificación

La OMS señala que la infertilidad es un problema de salud que afecta aproximadamente 186 millones de personas en todo el mundo. En la actualidad, las evaluaciones rutinarias del semen se utilizan ampliamente para predecir la capacidad de fertilización de los espermatozoides; sin embargo, en los últimos años se han sugerido técnicas adicionales para proporcionar un mejor diagnóstico y más completo, como el ensayo SCD, en combinación con tinciones citoquímicas complementarias como AB Y TB, que miden indirectamente el daño de la fragmentación al ADN, la compactación y estabilidad de la cromatina espermática.

Diferentes estudios clínicos asociados con la infertilidad masculina muestran en sus resultados que un ADN fragmentado es perjudicial para los resultados reproductivos, teniendo repercusión en las tasas de embarazo, un aumento de la pérdida del embarazo y un desarrollo embrionario deficiente. Por otro lado, hay evidencias que demuestran que los espermatozoides de los hombres infértiles poseen sustancialmente más daño en el ADN que los espermatozoides de los hombres fértiles. Asimismo, el éxito de la reproducción humana depende, en parte, de la integridad del ADN de los espermatozoides, pues estos están diseñados específicamente para la transmisión de un genoma haploide completo al ovocito para garantizar el desarrollo del embrión.

El análisis de semen convencional es el primer paso en la evaluación de los hombres infértiles y refleja el funcionamiento general de todos los órganos reproductores masculinos. En general, el volumen seminal, el pH, la concentración de espermatozoides, la motilidad, la vitalidad y la morfología se determinan de acuerdo con las directrices de la OMS, sin embargo, se ha demostrado que hasta el 40% de los hombres infértiles tienen parámetros

seminales dentro de los rangos de referencia normales siendo una de las limitaciones de esta técnica, por lo que resulta necesario buscar herramientas diagnósticas adicionales para mejorar la predicción de la fecundidad y dirigir las decisiones de manejo de las parejas infértiles. Por lo tanto, la evidencia emergente sobre el papel de la integridad del ADN de los espermatozoides en los resultados reproductivos y el desarrollo de ensayos de fragmentación del ADN de los espermatozoides abre un nuevo horizonte en la andrología clínica.

IV. Pregunta de investigación

¿Cómo se relaciona la calidad seminal, la fragmentación al ADN, el grado de compactación y la estabilidad de la cromatina espermática con la infertilidad masculina?

V. Hipótesis

Si los espermatozoides de pacientes infértiles muestran fragmentación del ADN y alteraciones en la estabilidad y compactación de la cromatina espermática, entonces se espera que estos factores estén asociados a problemas reproductivos en el varón y tengan un impacto positivo para el diagnóstico clínico de la infertilidad masculina.

VI. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar la calidad seminal, la fragmentación al ADN, el grado de compactación y la estabilidad de la cromatina espermática y su asociación (relación) con la infertilidad masculina.

6.2 Objetivos específicos

- Analizar los parámetros microscópicos y macroscópicos del semen en pacientes infértiles y donantes.
- Determinar el DFI en pacientes infértiles y donantes.
- Investigar la correlación entre los parámetros del semen y el DFI en pacientes infértiles y donantes.
- Obtener el porcentaje del grado de estabilidad de la cromatina espermática en pacientes infértiles y donantes.
- Obtener el porcentaje del grado de compactación de la cromatina espermática en pacientes infértiles y donantes.

VII. Materiales y métodos

7.1 Diseño experimental

Se contó con dos grupos: pacientes infértiles y donantes; para determinar el índice de fragmentación y calidad seminal, se analizaron 144 varones: 42 fueron donantes y 102 infértiles. Para las pruebas de la cromatina espermática, se analizaron 100 varones: 42 fueron donantes y 58 infértiles. Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación después de un mínimo de 2 y un máximo de 7 días de abstinencia sexual de pacientes sometidos a análisis de semen de rutina para la infertilidad de pareja, de acuerdo con las directrices de la OMS, 2021. Los criterios de la OMS se establecieron como valores de corte para cada uno de los siguientes factores: volumen de semen, concentración, recuento total de espermatozoides, motilidad y morfología normal (**Fig. 7**).

Para evaluar la SDF se utilizó la técnica SCD para obtener el DFI. Posteriormente, para determinar la integridad de la cromatina espermática, se utilizó la tinción AB y finalmente, para conocer el grado de inmadurez de la cromatina espermática la tinción TB (Fig. 7).

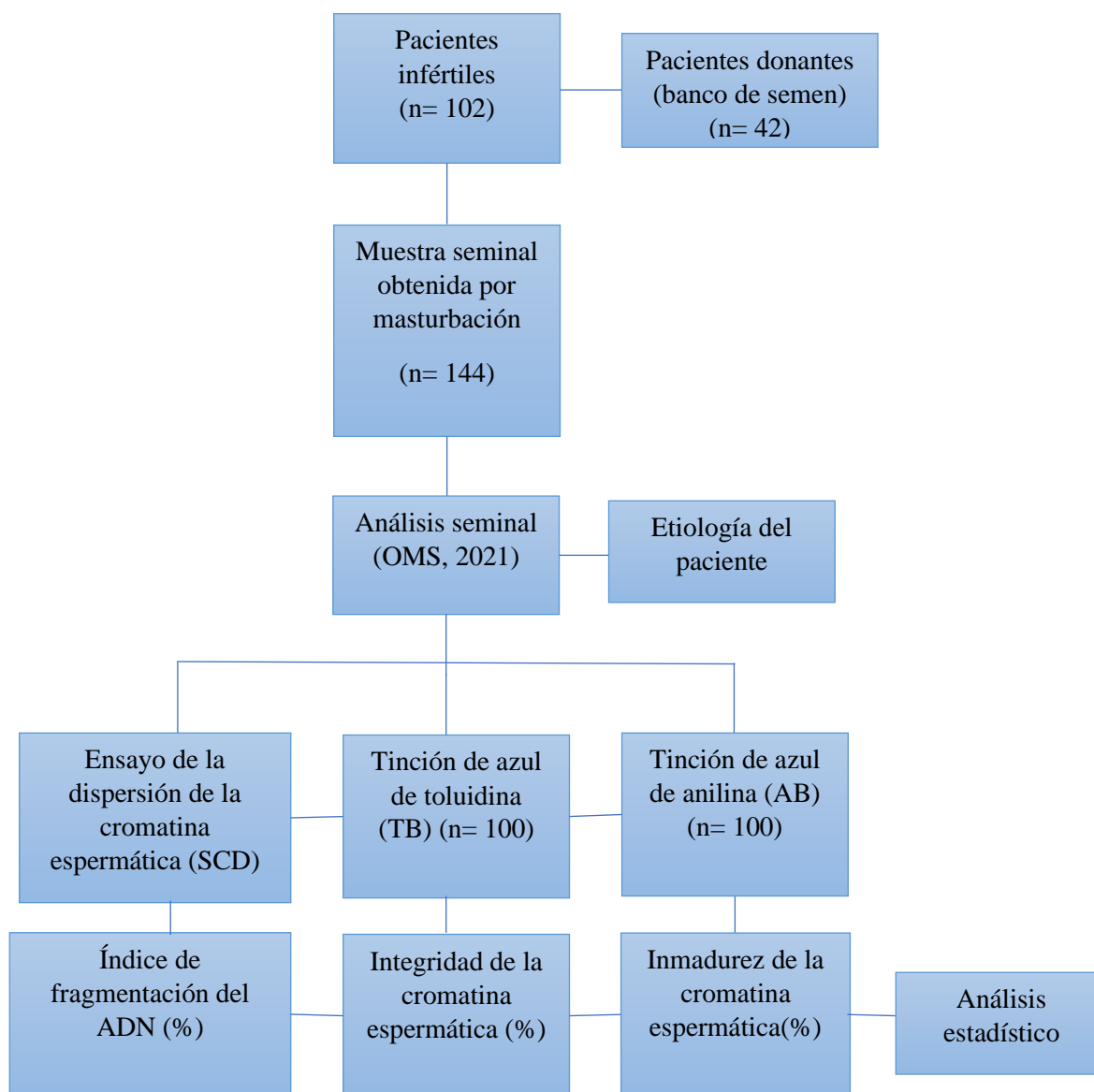


Figura 7. Diagrama de flujo que representa el diseño experimental.

7.2 Diseño del estudio y autorización ética

La investigación se llevó a cabo en la clínica de reproducción asistida HISPAREP, Hospital Español de la Ciudad de México, en el laboratorio de andrología. Todos los participantes del estudio dieron su consentimiento y firmaron formularios de consentimiento informado (Anexo).

Además, esta investigación fue parte integral del proyecto “Correlación de la madurez de la cromatina, estrés oxidante, fragmentación de ADN y metabolismo espermático con las tasas de fertilización, desarrollo embrionario, formación de blastocisto, tasa de embarazo y recién nacidos vivos en varones infértiles sometidos a técnicas de reproducción asistida”. Este estudio fue aprobado por el Dictamen del Comité Hospitalario de Bioética COMBIOETICA 09CHB10620171023, código asignado por el comité HISPCHB21-01.

7.3 Población de estudio

Este estudio fue de tipo retrospectivo e incluyó a pacientes infértiles y donantes atendidos en la clínica de reproducción asistida HISPAREP, entre febrero de 2020 y diciembre de 2022. Participaron un total de 144 pacientes masculinos para determinar la calidad seminal y el DFI. Mientras que para evaluar las pruebas citoquímicas de la cromatina espermática se incluyeron 100 varones. Las pruebas incluidas en el estudio fueron, análisis de los parámetros seminales, la prueba Kruger mediante el método Diff-Quik para observar la morfología de los espermatozoides, el ensayo SCD para determinar el DFI y las tinciones complementarias TB y AB para analizar el grado de compactación y la estabilidad cromatina espermática. Las variables consideradas en este estudio fueron la edad y los siguientes parámetros seminales: volumen (mL); concentración de espermatozoides (millones/mL);

recuento total de espermatozoides (millones); motilidad progresiva de los espermatozoides A+B (%); morfología de los espermatozoides (% de normalidad), fragmentación del ADN espermático (%); integridad e inmadurez de la cromatina espermática (%).

7.4 Participantes

Se incluyeron en el estudio todos aquellos pacientes varones que, siendo valorados por el área médica y que, por diagnóstico, presentaban un factor masculino alterado, previo a procedimientos de ART.

7.5 Examen y análisis de semen

Todas las muestras se recolectaron a través de la masturbación en un frasco estéril, después de 2-7 días de abstinencia. El análisis y examen de espermatozoides se llevó a cabo de acuerdo con las técnicas establecidas por la OMS, 2021. Después de la licuefacción completa a temperatura ambiente y antes de la preparación del semen, se observaron las siguientes características de acuerdo con las directrices de la OMS: volumen de eyaculación, concentración de espermatozoides, recuento total de espermatozoides, pH y motilidad. Para cada medición, se cargó una alícuota de 5 μ L de la muestra de semen en una cámara de recuento Makler y se analizó la concentración y la motilidad de los espermatozoides. Para analizar la morfología se utilizó la prueba de Kruger en la que se realizó un frotis seminal y se tiñó mediante el método Diff-Quik. Posteriormente se dejaron secar. Finalmente, cada preparación se examinó con inmersión de aceite a 1000X en microscopía de campo brillante con contraste de fases (Le *et al.*, 2019).

7.6 Ensayo de la dispersión de la cromatina espermática

La fragmentación del ADN espermático se cuantificó mediante la técnica de Halosperm (Fernández *et al.*, 2003). Utilizando Halosperm Kit (Halotech DNA). Las muestras seminales de los pacientes infértiles y donantes se diluyeron en medio de cultivo (hasta alcanzar una concentración de 5 y 10 millones/mL). El tubo eppendorf con agarosa (bajo punto de fusión) se calentó durante 5 minutos a 90° a 100°C. Luego, se agregaron 20 µL de semen diluido y se homogeneizaron. 10µL de este homogeneizado se colocaron en un portaobjetos pretratado con agarosa (punto de fusión normal) y se cubrieron con un portaobjetos de cubierta de 22x22 mm. Los portaobjetos se colocaron bajo refrigeración a 4°C durante 7 min. Luego, los portaobjetos de la cubierta se retiraron suavemente y agregamos la solución ácida (20 µL de HCl agregado a 2.5 mL de agua destilada) durante 7 min. Después de la eliminación de esta solución, agregamos la solución de lisis durante 15 minutos. Luego se retiró la solución de lisis y el portaobjetos se colocó en agua destilada y alcohol (70%, 90% y 100%) durante dos minutos cada uno. Se dejó secar a temperatura ambiente, y luego se tiñó con tinte Wright. Se analizaron 500 espermatozoides por duplicado en el portaobjetos para determinar el DFI. Se presentan 5 tipos de halos: grande, mediano, pequeño, sin halo y degradado. El halo grande y mediano se considera como espermatozoides con fragmentación normal del ADN y halo pequeño, sin halo y degradados como espermatozoides de ADN fragmentado.

El DFI se calculó con la siguiente formula:

$$DFI (\%) = 100 \times \frac{N_o \text{ de espermatozoides con ADN fragmentado}}{N_o \text{ de espermatozoides contabilizados}}$$

7.7 Determinación de la integridad de la cromatina TB

Para hacer esta tinción, después del secado al aire de los frotis de las muestras de semen se fijaron en etanol-acetona fresca al 96% (1: 1) a 4 °C durante 30 min y luego se hidrolizaron en 0.1 NHCl a 4 °C durante 5 min. Los portaobjetos se enjuagaron tres veces en agua destilada durante 2 min y finalmente se tiñeron con 0.05% TB en tampón McIlvaine al 50% (pH = 3.5) durante 10 min a temperatura ambiente. La calidad de la cromatina de los espermatozoides se determinó de acuerdo con la tinción metacromática de las cabezas de los espermatozoides con la ayuda de microscopía de luz se contaron 500 espermatozoides. Las cabezas de espermatozoides de color azul pálido se consideraron normales y los espermatozoides de color azul oscuro o violeta o púrpura se clasificarán en células anormales (Pourmasumi *et al.*, 2019a).

7.8 Determinación de la inmadurez de la cromatina AB

Para realizar esta tinción, el frotis de espermatozoides frescos de cada grupo experimental se dejó secar y luego se fijó en glutaraldehído tamponado al 3% en tampón de fosfato de 0,2 M (pH = 7.2) durante 30 min a temperatura ambiente. Cada frotis se trató con tinción ACUOSA AB al 5% (BDH, Poole, UK, Cat. No. 34003) 5 g de polvo en agua destilada de 100 ml) en ácido acético al 4% (pH=3.5) durante 5 min se contaron 200 espermatozoides en cada preparación por microscopía de luz. Las células teñidas de azul pálido o no teñidas y las células de color azul oscuro se consideraron espermatozoides normales y anormales, respectivamente (Pourmasumi *et al.*, 2019a).

7.9 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DE). Para la comparación estadística entre los diferentes grupos, se probó la significación de la diferencia mediante la prueba de U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis. Los análisis de regresión y correlación se realizaron utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. El nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$.

VIII. Resultados

La edad de los pacientes varió de 19 a 51 años y presentó valores significativamente mayores para el grupo de pacientes infértiles con una media de 39.97 ± 6.70 , mientras que para el grupo de pacientes donantes fue de 31.76 ± 7.82 . Por otro lado, el volumen de semen obtenido para los dos grupos disminuyó significativamente en los pacientes infértiles en comparación con el grupo de donantes, 2.59 ± 1.22 , 4.15 ± 1.21 , respectivamente (**Tabla 2**).

Tabla 2. Edad del paciente y volumen de semen entre los grupos donantes e infértiles.

Parámetro	Donantes n= 42	Infértiles n= 102
Edad del paciente	31.76 ± 7.82	$39.97 \pm 6.70^*$
Volumen	4.15 ± 1.21	$2.59 \pm 1.22^*$

Los valores se expresan como la Media \pm DE. Prueba de U Mann-Whitney, $*p < 0.05$.

Los donantes presentaron valores significativamente mayores ($p = < 0.05$) en concentración, motilidad progresiva, no progresiva e inmóviles y morfología normal, y un valor significativamente menor en el DFI (19.37 ± 6.91), en comparación con el grupo de pacientes infértiles quienes mostraron un DFI más elevado (29.75 ± 9.03) (**Tabla 3**). La misma tendencia se observó al calcular el porcentaje del índice de deformidades (ID), el grupo de pacientes infértiles mostró un porcentaje mayor significativamente (2.28 ± 0.26) en comparación con el grupo de donantes (2.12 ± 0.26). Sin embargo, al calcular el índice de anormalidades múltiples (IAM) y el índice de teratozoospermia (IT), no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes para ambos grupos experimentales.

Tabla 3. Comparación de los parámetros seminales y el índice de fragmentación del ADN.

Parámetro	Donantes	Infértiles	p
Concentración (millones/mL)	81.09 ± 10.88	32.22 ± 21.04	<0.05*
Progresivos (%)	58.78 ± 16.04	37.20 ± 14.06	<0.05*
No progresivos (%)	27.26 ± 15.75	13.87 ± 4.38	<0.05*
Inmóviles (%)	13.47 ± 4.20	49.06 ± 13.60	<0.05*
Morfología normal (%)	6 ± 2.32	2.13 ± 1.03	<0.05*
Morfología anormal (%)	94 ± 2.32	97.09 ± 7.47	<0.05*
IAM (%)	2.11 ± 0.19	2.23 ± 0.64	>0.05
IT (%)	2.26 ± 0.23	2.40 ± 0.66	>0.05
ID (%)	2.12 ± 0.26	2.28 ± 0.26	<0.05*
DFI (%)	19.37 ± 6.91	29.75 ± 9.03	<0.05*

Los valores se expresan como Media ± DE. Prueba de U Mann-Whitney, * $p < 0.05$. IAM: Índice de Anormalidades Múltiples, IT: Índice de Teratozoospermia. ID: Índice de Deformidades, DFI: Índice de Fragmentación del ADN.

En la **Tabla 4** se presentan las etiologías más frecuentes asociadas con la infertilidad masculina y una comparación con los parámetros seminales de los diferentes grupos. Encontrándose que la etiología más frecuente es la teratozoospermia, seguida de la oligoastenoteratozoospermia, la aztenoteratozoospermia y por último los normozoospermicos. El DFI más alto lo presentó el grupo de oligoastenoteratozoospermia

(36.79 ± 9.08) y el más bajo los normozoospermicos (23.04 ± 7.67), aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos. El parámetro de concentración fue más bajo en el grupo con oligoastenoteratozoospermia, mientras que la motilidad progresiva fue menor en el grupo de aztenoteratozoospermia y, por lo tanto, también la motilidad no progresiva donde se presentan diferencias significativas entre los grupos. Por último, la morfología más baja la presentó el grupo con oligoastenoteratozoospermia siendo significativa entre los grupos.

Tabla 4. Etiologías y parámetro seminales entre los diferentes grupos.

Parámetro	Astenoteratozoospermia n= 13	Normozoospermia n= 10	Oligoastenoteratozoospermia n= 14	Teratozoospermia n= 54
Concentración (millones/mL)	$31 \pm 15.84^*$	$48 \pm 11.34^*$	$15.64 \pm 10.23^*$	$44.35 \pm 12.39^*$
Progresivos (%)	19.15 ± 8.45	24.5 ± 19.72	21.28 ± 6.06	29.88 ± 18.66
No progresivos (%)	$48.5 \pm 20.87^*$	$31.5 \pm 14.40^*$	$44.21 \pm 23.10^*$	$30.55 \pm 18.02^*$
Inmóvil (%)	91.07 ± 17.02	81.3 ± 30.73	85.21 ± 19.60	70.27 ± 31.32
Morfología normal (%)	$2 \pm 0.70^*$	$4.2 \pm 0.42^*$	$1.28 \pm 0.46^*$	$2.18 \pm 0.6^*$
Morfología anormal (%)	$98 \pm 0.70^*$	$95.8 \pm 0.42^*$	$98.64 \pm 0.49^*$	$97.81 \pm 0.61^*$
DFI (%)	33.66 ± 5.93	23.04 ± 7.67	36.79 ± 9.08	26.78 ± 6.09

Los valores se expresan como Media \pm DE. Prueba de Kruskal-Wallis, $*p < 0.05$.

En la **Tabla 5**, se muestran los resultados de correlación entre el índice de fragmentación del ADN espermático y los parámetros del semen. La concentración, morfología normal de espermatozoides y el DFI en pacientes infértiles presentaron una correlación negativa significativa, mientras la correlación fue positiva y significativa para la edad y la morfología anormal de los espermatozoides.

Tabla 5. Correlación entre el índice de fragmentación del ADN espermático y los parámetros del semen.

Parámetro	Coefficiente de correlación	<i>p</i>
Edad	0.26408	<0.05*
Volumen (mL)	-0.11418	>0.05
Vitalidad (%)	-0.1455	>0.05
Concentración (millones/mL)	-0.4605	<0.05*
Progresivos (%)	-0.5033	>0.05
No progresivos (%)	0.1687	>0.05
Inmóvil (%)	0.4704	>0.05
Morfología normal (%)	-0.5065	<0.05*

Morfología anormal (%)	0.4684	<0.05*
IAM (%)	0.0825	>0.05
IT (%)	0.0615	>0.05
ID (%)	0.0668	>0.05

Correlación de Spearman, * $p < 0.05$. IAM: Índice de Anormalidades Múltiples, IT: Índice de Teratozoospermia. ID: Índice de Deformidades, DFI: Índice de Fragmentación del ADN.

Fragmentación del ADN espermático

Como se observó en las tablas anteriores el valor medio de DFI de espermatozoides fue mayor en el grupo de pacientes infértiles en comparación con el grupo fértil o donantes. En el panel A de la **Figura 8** podemos inferir en base con el tamaño del halo, espermatozoides con ADN integro, con el halo característico de la prueba SCD, que corresponde al grupo de donantes. Por otro lado, en el panel B se infieren espermatozoides del grupo infértil en donde se puede apreciar notablemente espermatozoides con el ADN fragmentado y morfología anormal de los espermatozoides, pudiéndose distinguir entre hombres infértiles de hombres fértiles.

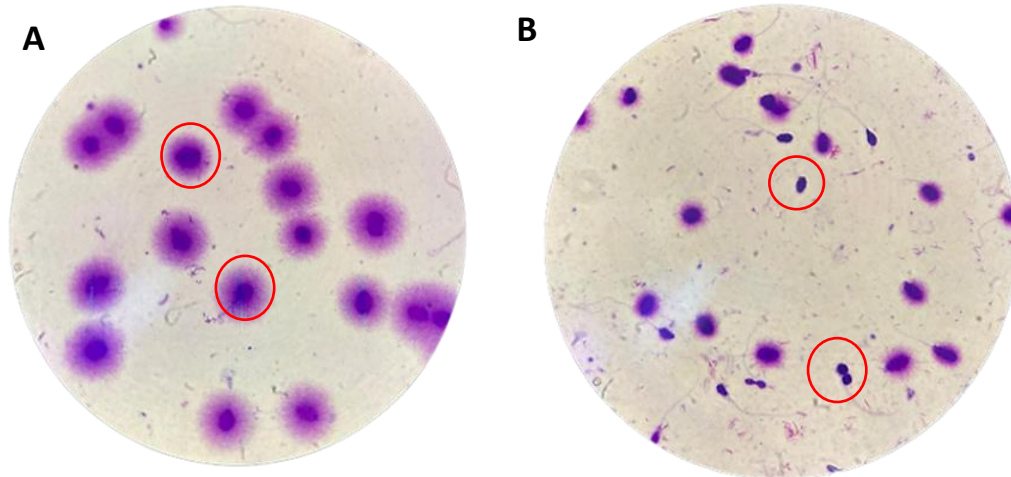


Figura. 8. Fotografía por microscopio óptico durante la prueba SCD. **A**, donantes, **B**, pacientes infértiles. Los círculos señalan la presencia y ausencia del halo característico del ensayo SCD en donantes y pacientes infértiles, respectivamente. Aumento 100X.

Estabilidad de la cromatina espermática (tinción AB)

Para esta tinción metacromática las cabezas de los espermatozoides se consideraron las siguientes puntuaciones: (0) azul claro (buena cromatina); (1) violeta (anormalidad); azul oscuro (2) (anormalidad). Los espermatozoides con puntuación 0 se consideraron células normales y con cabezas violetas y moradas (puntuaciones 1 y 2) se consideraron células anormales.

Se observó una diferencia significativa de espermatozoides teñidos con AB en los tres parámetros medidos, entre el grupo de donantes en comparación con el grupo de pacientes infértiles. Para las células normales el grupo de donantes posee una mejor cromatina con respecto a los pacientes infértiles (183.86 ± 7.52 frente a 117.15 ± 21.83). Por otro lado, la cromatina con mayores anomalías la presentaron los pacientes infértiles (puntuaciones 1 y 2) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Resultados de azul de anilina (AB) en grupos infértiles y donantes

Parámetro	Donantes n= 42	Infértiles n=58	p
(0) Azul claro (%)	183.86 ± 7.52	117.15 ± 21.83	<0.05*
(1) Violeta o morado (%)	6.21 ± 3.75	16.31 ± 7.34	<0.05*
(2) Azul oscuro (%)	9.21 ± 4.86	69.08 ± 24.92	<0.05*

Los valores se expresan como Media ± DE. Prueba de U Mann-Whitney, * $p < 0.05$.

Compactación de la cromatina espermática (tinción AT)

Las cabezas de los espermatozoides con buena integridad de la cromatina eran de color azul claro (0) ; sin embargo, los de integridad disminuida eran de color azul intermedio y purpura oscuro (1 y 2).

La misma tendencia se observó para esta tinción pues los pacientes donantes presentaron mayor integridad de células normales, es decir, buena compactación de la cromatina espermática en comparación con los pacientes infértiles estadísticamente significativa (421.69 ± 27.07 frente a 356.50 ± 44.44), mientras que los pacientes infértiles presentaron una menor compactación de la cromatina (62.07 ± 25.84 frente a 122.62 ± 39.01) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Resultados de azul de toluidina (AT) en grupos infértiles y donantes.

Parámetro	Donantes n= 42	Infértiles n=58	P
(0) Azul claro (%)	421.69 ± 27.07	356.50 ± 44.44	<0.05*
(1) Azul intermedio (%)	19.95 ± 7.72	21.40 ± 12.83	>0.05
(2) Purpura oscuro (%)	62.07 ± 25.84	122.62 ± 39.01	<0.05*

Los valores se expresan como Media ± DE. Prueba de U Mann-Whitney, * $p < 0.05$.

IX. Discusión de resultados

La infertilidad es un trastorno reproductivo complejo y es bien sabido que uno de los factores más importantes que afecta al gameto masculino es la integridad del ADN (Machorro *et al.*, 2018). La infertilidad masculina ha aumentado en las últimas décadas y ahora representa entre el 20% y el 70% de la infertilidad en todo el mundo. Además, se sabe que entre el 20 y el 30% de los casos son causados por el factor masculino, y aproximadamente el 50% de los casos se deben en parte a una disminución de los parámetros en general de la calidad seminal (Zhang *et al.*, 2023).

Se ha demostrado que un alto porcentaje de espermatozoides con anomalías en la cromatina están asociados con fallas en las TRA. Por ejemplo, se ha informado que los tratamientos altamente complejos reducen las tasas de fertilidad e implantación, lo que resulta en una mala calidad y bloqueo del embrión, así como un incremento del aborto (Machorro *et al.*, 2018). La fragmentación del ADN espermático es un problema cada vez más común para los hombres que sufren de infertilidad. Aunque sus causas aún no estén claras, se sabe que los factores ambientales y de estilo de vida, así como la exposición a ciertas sustancias químicas, el tabaquismo y el estrés, pueden aumentar el riesgo de fragmentación del ADN en los espermatozoides.

Otros autores corroboran con estudios una fuerte asociación entre los altos niveles seminales de ROS y el daño del ADN espermático. Aunque el SG es uno de los mecanismos clave subyacentes al daño del ADN espermático. La literatura menciona, que se necesita un nivel basal de ROS para procesos como la capacitación de espermatozoides, la reacción acrosomal y la fusión de espermatozoides y ovocitos. Pero la producción

descontrolada o en exceso de ROS puede tener efectos devastadores en las funciones de los espermatozoides. Varios estudios han demostrado que la inducción de cascadas de peroxidación lipídica y la fragmentación del ADN son dos consecuencias patológicas principales de la producción de ROS en los espermatozoides (Bassiri *et al.*, 2020).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente el análisis seminal es el examen de rutina principal para diagnosticar la infertilidad masculina en los laboratorios de andrología. El análisis seminal evalúa la calidad de los espermatozoides, incluida la concentración, la vitalidad, la morfología y otros parámetros, principalmente en función de las propiedades microscópicas y macroscópicas de los espermatozoides. Estos parámetros convencionales proporcionan información básica para evaluar la fertilidad masculina. Sin embargo, el análisis seminal tiene limitaciones para el uso clínico, pues los parámetros seminales de rutina no pueden evaluar con precisión la fertilidad masculina (aproximadamente el 15% de los hombres infértiles mostraron parámetros seminales normales) Además, los valores de referencia de los parámetros de semen de rutina no son totalmente equivalentes a las evaluaciones de fertilidad. Esto sugiere que el análisis seminal por sí solo proporciona información limitada para evaluar la fertilidad masculina y no refleja completamente la fertilidad de los espermatozoides (Liu *et al.*, 2023).

Asimismo, el DFI de espermatozoides ha demostrado ser un complemento importante para la evaluación de rutina del semen, desde la concentración, morfología y otros niveles hasta el nivel molecular. Se ha informado que un DFI afecta negativamente la calidad del semen y los resultados de las TRA (Liu *et al.*, 2023).

En este estudio, el DFI de espermatozoides se detectó por el método SCD en pacientes masculinos y se correlaciono con la edad, los parámetros de rutina del semen y las

tasas de anomalías de los espermatozoides. En cuanto a la edad de los pacientes se observó una tendencia significativamente mayor para el grupo de pacientes infértiles con una media de 39.97 ± 6.70 , mientras que para el grupo de pacientes donantes fue de 31.76 ± 7.82 . Estos resultados sugieren que a mayor edad existe una disminución de la calidad seminal, la cual pudiera estar relacionada con el cambio en la función testicular, el daño causado por enfermedades urológicas y el SG o bien, una posible disminución de los niveles de testosterona. Se ha observado un nivel bajo de testosterona sérica en sangre en aproximadamente el 15% de los hombres infértiles, pues como se sabe la testosterona es el principal andrógeno que regula la espermatogénesis en los testículos (Di Guardo *et al.*, 2020).

Asimismo, el volumen del eyaculado fue menor en el grupo de los pacientes infértiles que en nuestro grupo de donantes, este parámetro es muy importante en la evaluación de la infertilidad masculina, ya que para que el espermatozoide llegue a fertilizar el ovocito en el tracto reproductor femenino se requiere un volumen adecuado de eyaculado, estos resultados se podrían explicar debido al tiempo de abstinencia entre los pacientes infértiles y donantes, ya que en los primeros 4 días después de la eyaculación, el volumen de semen aumenta un 11.9% por día (Roberts & Jarvi, 2009). La literatura reporta que en general, el hallazgo de un eyaculado de bajo volumen en el análisis de semen puede deberse a causas psicógenas de disfunción eyaculatoria (anorgasmia psicógena) y diversas causas patológicas (eyaculación retrógrada, obstrucción del conducto eyaculatorio, enfermedad de las vesículas seminales, hipogonadismo entre otras) (Roberts & Jarvi, 2009).

Ahora bien, los pacientes donantes presentaron valores significativamente mayores ($p = <0.05$) en concentración, motilidad progresiva, no progresiva e inmóviles y morfología normal, y un valor significativamente menor en el DFI (19.37 ± 6.91), en

comparación con el grupo de pacientes infértiles quienes mostraron un DFI más elevado (29.75 ± 9.03). Evenson *et al.*, en 2002 categorizaron estadísticamente el DFI siendo: $\leq 15\%$ DFI = excelente potencial de fertilidad; 15-24% DFI = alto potencial de fertilidad; 25-30% DFI= bajo potencial de fertilidad y finalmente, potencial muy bajo si el DFI= $\geq 30\%$ (Evenson *et al.*, 2002). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, para este estudio los pacientes infértiles presentaron un bajo potencial de fertilidad, en comparación con los donantes categorizados con un alto potencial de fertilidad.

Nuestros hallazgos son básicamente consistentes con algunos resultados reportados como el de Cánovas *et al.*, 2008, quienes mencionan que la edad del paciente está íntimamente relacionada con la disminución del número de espermatozoides, con la disminución del número de formas móviles y con el aumento de las inmóviles (Cánovas *et al.*, 2008). Se ha informado también que el DFI aumenta con la edad en los hombres, y estudios que mencionan que aproximadamente el 8% de los hombres infértiles tienen valores altos de DFI ($\geq 30\%$) (Okubo *et al.*, 2023). Esta fragmentación anormal en los pacientes infértiles puede ocurrir durante la espermatogénesis intratesticular o en la fase posttesticular, por ejemplo, junto con el tránsito en el epidídimo, como resultado de la apoptosis por exceso de radicales libres de oxígeno, o por malos hábitos de vida, como el consumo de drogas, el tabaquismo y las malas condiciones de trabajo que conducen a un aumento de la temperatura escrotal, pero también como resultado de condiciones clínicas, como el varicocele o la exposición a contaminantes ambientales específicos (Ferrigno *et al.*, 2021).

Un factor preocupante es que alrededor del 30% de los pacientes que buscan servicios de ART tienen altas tasas de roturas del ADN en los espermatozoides. Además, aunque los espermatozoides con ADN fragmentado pueden fertilizar un ovocito con un éxito

similar a la fertilización con espermatozoides no fragmentados, el impacto negativo de la cromatina paterna dañada generalmente se manifiesta como un compromiso en su desarrollo y posterior implantación (Lourenço *et al.*, 2023).

Interesantemente, la etiología más frecuente es la teratozoospermia, seguida de la oligoastenoteratozoospermia, la aztenoteratozoospermia y por último los normozoospermicos. Sin embargo, el DFI más alto lo presentó el grupo de oligoastenoteratozoospermia. La literatura menciona que es el resultado de una diferenciación celular defectuosa durante la espermatogénesis y se ha asociado con varios factores genéticos y ambientales, así como con la edad paterna avanzada y la angustia psicológica. La teratozoospermia ocurre frecuentemente en combinación con oligozoospermia, asimismo, la morfología anormal de los espermatozoides también se vinculó con niveles elevados de ROS en el semen, lo que contribuyó al daño del ADN de los espermatozoides (Candela *et al.*, 2021).

La correlación entre DFI y los parámetros espermáticos mostró que la concentración y morfología normal de espermatozoides en pacientes infértiles se correlacionó significativamente negativamente con DFI, mientras que se correlacionó positiva y significativamente con la edad y la morfología anormal de espermatozoides. En cuanto a la morfología de los espermatozoides, se ha informado que las anomalías de la cabeza, especialmente las cabezas amorfas, están relacionadas con el grado elevado de fragmentación del ADN. Por otro lado, estos resultados podrían explicarse a los cambios epigenéticos y las mutaciones en el ADN, junto con las aneuploidías cromosómicas, se han asociado con el aumento de la edad paterna, así como el estrés y el estilo de vida pueden afectar también el daño en el ADN de los espermatozoides (Le *et al.*, 2019).

Los resultados concuerdan con lo publicado por Campos *et al.*, 2021 en donde determinaron la correlación entre los parámetros seminales y el DFI en 418 hombres que asistieron a un centro de fertilidad, sus resultados sugieren que un espermograma anormal no solo refleja una espermatogénesis alterada, sino también un efecto negativo en el ADN del espermatozoide, y una DFI alta se acompaña de un deterioro significativo de todos los parámetros seminales.

Otros resultados similares a los de Akhavizadegan *et al.*, 2023 los cuales encontraron en su investigación que el DFI se correlacionó notablemente con la edad y los parámetros del semen mediante la técnica SCD. Observando en los pacientes con un análisis de semen anormal un nivel estadísticamente significativo más alto de fragmentación del ADN. Interesantemente, el diez por ciento de los pacientes con análisis de semen normal o ligeramente anormal presentaron un DFI anormalmente alto, por lo que sugieren verificar el DFI en todas las parejas con problemas de fertilización, incluso en presencia de un análisis de semen normal.

Por otro lado, Yu *et al.*, 2022 realizaron un trabajo en hombres de parejas con pérdida de embarazo, encontrando que los hombres con alta SDF y teratozoopermia sufren de una mayor incidencia de disfunción eréctil.

Ribas *et al.*, 2022 demostraron que la integridad del ADN espermático juega un papel crucial para el desarrollo embrionario después de ICSI, especialmente cuando se utilizan ovocitos de buena calidad de donantes jóvenes, concluyendo que el daño del ADN

del espermatozoide tiene un impacto perjudicial en las tasas de fertilización después de ICSI y retrasa el desarrollo embrionario.

Zhang *et al.*, 2023, reportó en su trabajo titulado “The influence and mechanistic action of sperm DNA fragmentation index on the outcomes of assisted reproduction technology”, señalan que el DFI anormalmente elevado redujo la tasa de embriones trasplantables de alta calidad, implantación, embarazo clínico, parto y nacidos vivos después de FIV, y aumentó la probabilidad de aborto temprano por ciclo de transferencia ($P < 0,05$) . Sin embargo, no hubo una correlación significativa entre DFI y la tasa de fertilización, la tasa de escisión, la tasa de trasplantes, la tasa de embriones de alta calidad, la tasa de implantación, la tasa de embarazo clínico, la tasa de aborto temprano, la tasa de parto y la tasa de nacidos vivos con la asistencia de ICSI ($P > 0,05$). Concluyendo que la integridad del ADN espermático es crucial para la fertilización y el desarrollo de una descendencia saludable.

Es importante señalar que el último manual para la examinación del semen humano 6ª edición de la OMS, a pesar de proponer cambios positivos, introdujo "límites de decisión" y asumió que una evaluación óptima de la fertilidad masculina debería basarse en una combinación de la información recopilada del análisis de semen y otros parámetros clínicos disponibles. Además, la 6ª edición de la OMS confirmó la importancia de la integridad del ADN de los espermatozoides con una demostración de las diferentes técnicas, al tiempo que reconoció el papel de la prueba SDF en el contexto de la infertilidad masculina (Calogero *et al.*, 2023).

Más aun, el manual de la 6ª edición carece de varios aspectos. Por ejemplo, los datos sobre hombres fértiles de América del Sur y África subsahariana están escasamente

representados. También hay una falta de umbrales de referencia claros para ser aplicados en lugar de los percentiles de los parámetros seminales básicos de la quinta edición. Esto podría obstaculizar la capacidad del médico para hacer una evaluación correcta, ya que los límites de decisión aún no se han aclarado en la práctica. Por lo tanto, los profesionales de todo el mundo pueden preferir continuar utilizando los valores de referencia de la quinta edición en lugar de la edición actual. El manual más detallado de la sexta edición también corre el riesgo de ser demasiado técnico, lo que podría retrasar su uso generalizado entre los médicos. Aunque en esta última edición se reconoció que la prueba de SDF tenía un papel en la evaluación del paciente infértil, como se mencionó anteriormente, se ha citado como una de las principales fortalezas del nuevo manual, no se describen los valores umbral (de corte) ni las indicaciones para la prueba SDF y los criterios para interpretar los resultados de la prueba. Además, las pruebas avanzadas para la SG seminal parecían ser más para fines de investigación que para uso clínico real (Calogero *et al.*, 2023).

En cuanto a las técnicas para evaluar la SDF el ensayo TUNEL utiliza nucleótidos fluorescentes para identificar "muecas" de ADN o extremos libres. El ensayo cometa emplea electroforesis neutra y alcalina para evaluar los muchos patrones de daño del ADN por célula. SCSA y TUNEL requieren una citometría de flujo y/o un microscopio de fluorescencia que reduce su atractivo para los laboratorios de andrología clínica debido al costo del equipo necesario. El ensayo COMETA no es apropiado para el diagnóstico rápido y requiere personal altamente especializado para interpretar los resultados. Basado en la idea de que los espermatozoides fragmentados no crean el halo distintivo de bucles de ADN dispersos que se ven en los espermatozoides con ADN no fragmentado después de la desnaturalización ácida y la eliminación de proteínas nucleares, la SCD, también conocida

como la prueba del halo, se utiliza para identificar los espermatozoides. El método es sencillo y no se necesita ningún equipo sofisticado. Aunque es un ensayo competente para la cuantificación de DFI, la clasificación de los halos puede tener cierta subjetividad entre los observadores (Kumar *et al.*, 2023).

La evaluación de a través de la tinción AB y TB podrían considerarse como una de las pruebas complementarias del análisis de semen para la evaluación del factor masculino, pues su función está influenciada por la estructura de la cromatina de los espermatozoides y la integridad de su ADN. La estabilidad y la capacidad de eliminación de varias modificaciones de histonas son importantes para la espermatogénesis normal. Las modificaciones de las histonas pueden afectar la estructura de la cromatina y la expresión génica en las células germinales (Kuchta *et al.*, 2020).

El interés sigue creciendo en la condensación de la cromatina de los espermatozoides, es decir, cómo la protaminación y las histonas retenidas influyen en el estado epigenético de los espermatozoides maduros. Por lo tanto, ahora se utilizan ampliamente métodos indirectos basados en diversas técnicas de tinción para cuantificar la protamina y determinar la integridad de la cromatina (Kuchta *et al.*, 2020).

Nuestros resultados muestran una diferencia significativa de espermatozoides teñidos con AB en los tres parámetros observados en la coloración (0,1,2) entre el grupo de donantes en comparación con el grupo de pacientes infértiles, lo que sugiere que en estos últimos los espermatozoides presentan una inmadurez anormal de la cromatina, pues se ha demostrado que la condensación de la cromatina espermática inducida por las protaminas es esencial para el potencial normal de fertilidad de los espermatozoides y, posteriormente, para la fertilización normal y el desarrollo embrionario. Estos cambios patológicos en la estructura

de la cromatina espermática comúnmente son causados por un reemplazo defectuoso de protaminas por histonas, alterando la integridad del ADN. Los espermatozoides con tales defectos pueden tener una estructura morfológica normal, pero son disfuncionales en cuanto a la calidad del material genético. Estudios recientes sugieren que las histonas espermáticas y las modificaciones específicas de la metilación de las histonas pueden desempeñar un papel importante después de la fertilización (Kuchta *et al.*, 2020).

Pues como se sabe la espermatogénesis incluye la proliferación, el ADN meiótico y la diferenciación de las espermátidas en espermatozoides. Debido a la complejidad y al período relativamente largo de la espermatogénesis, el ADN de los espermatozoides y la cromatina pueden alterarse en cualquier etapa de este proceso. Durante la fase de espermiogénesis, las histonas nucleares son reemplazadas primero por proteínas de transición y luego por protaminas. La estabilidad de la cromatina se logra mediante la formación de enlaces disulfuro durante el tránsito epididimario de los espermatozoides (Pourmasumi *et al.*, 2017).

Además, hay estudios que mencionan que existe una relación negativa entre la calidad de la cromatina espermática y los parámetros de los espermatozoides, incluida la morfología y la motilidad. La presencia de espermatozoides con morfología anormal indica que los espermatozoides no pueden completar el proceso de espermiogénesis, el daño de la cromatina / ADN de los espermatozoides puede ocurrir en los testículos, los conductos genitales masculinos y también después de la eyaculación (Pourmasumi *et al.*, 2017).

La tinción con TB es muy simple, útil y económica para evaluar la integridad de la cromatina y las anomalías del ADN, los resultados indican que los pacientes infértiles poseen más daño, pues se observaron coloraciones azul intermedio y púrpura oscuro en los

espermatozoides, lo que indica una cromatina anormal y muy anormal, en contraste con los pacientes donantes quienes presentaron un espectro de azul brillante (espermatozoides con cromatina normal), estos resultados se relaciona con la tinción AB, mostrando que los pacientes infértiles además de presentar una inmadurez de la cromatina espermática, también se asocia a bajos porcentajes de la integridad de la cromatina espermática, en comparación con los donantes quienes presentaron mayor porcentaje en cuanto la inmadurez e integridad de la cromatina.

Kim *et al.*, 2013, en su trabajo cuyo objetivo era el examinar la relación entre la edad masculina, la morfología estricta y la estructura y condensación de la cromatina espermática mediante la tinción AB y TB, sus resultados muestran que la condensación anormal de la cromatina espermática se asoció positivamente con la estructura de la cromatina espermática ($r = 0,594$, $p = 0,000$) y mostró una correlación negativa con la morfología estricta ($r = -0,219$, $p = 0,029$). Por otro lado, Talebi *et al.*, 2012: realizaron cuatro pruebas citoquímicas diferentes, incluyendo azul de anilina (AB), azul de toluidina (TB) para analizar los espermatozoides. Concluyendo que había una correlación significativa entre la fragmentación del ADN y la pérdida recurrente del embarazo.

Bichara *et al.*, 2019 utilizaron la técnica AB para evaluar el grado de condensación de la cromatina espermática mostrando que los hombres infértiles poseían más espermatozoides con defectos de condensación de cromatina y fragmentación del ADN que los hombres fértiles, sin embargo, los análisis univariados y multivariados confirmaron que solo los defectos de condensación de la cromatina espermática fueron un factor predictivo negativo de los resultados de la ICSI. Por otro lado, los defectos de protaminación observados en los espermatozoides con condensación anormal de la cromatina redujeron la tasa de

fertilización y la calidad del embrión después de la ICSI, se ha reportado también que la expresión alterada de protaminas también se ha asociado con una disminución en la calidad del espermatozoide y el embrión entre las parejas que usan ART.

Pourmasumi *et al.*, 2019b por otro lado, señala en su trabajo titulado “Cytochemical tests to investigate sperm DNA damage: Assessment and review”, que el uso de la tinción AB muestran una clara correlación entre la anomalía de la cromatina espermática y la infertilidad, por lo que puede ser un buen predictor de los resultados de la FIV. En cuanto a la tinción TB los resultados mostró que el umbral de la prueba de TB para predecir la fertilidad masculina es del 45%. Se ha informado que SCSA y TB son efectivos para medir la madurez de la cromatina espermática en hombres fértiles.

Finalmente, se sabe que se pueden usar pruebas complementarias de cromatina espermática para detectar cualquier defecto de la cromatina y pueden proporcionar información completa sobre la integridad del ADN espermático que no puede evaluarse mediante análisis seminal estándar y de rutina en laboratorios de andrología (Pourmasumi *et al.*, 2019b).

X. Conclusiones

- La realización de una prueba de fragmentación del ADN de los espermatozoides, además de un examen de semen basado en los criterios de la OMS, puede ser de utilidad clínica en los laboratorios de andrología para un diagnóstico más preciso en el tratamiento de pacientes con infertilidad masculina.
- Los pacientes infértiles presentaron un bajo potencial de fertilidad, en comparación con los donantes categorizados con un alto potencial de fertilidad, de acuerdo con el DFI obtenido.
- El DFI de espermatozoides se correlaciona con la edad, la concentración de espermatozoides, la motilidad de los espermatozoides y la morfología.
- El ensayo SCD puede demostrar la presencia de fragmentación del ADN en los espermatozoides.
- Los pacientes infértiles presentaron mayores porcentajes de inmadurez e integridad de la cromatina espermática en comparación con el grupo de donantes.
- La incorporación de tinciones complementarias (AB y TB) aportan información relevante del daño postmeiótico que puede ocurrir en el ADN de los espermatozoides en pacientes infértiles, pudiendo ser una herramienta diagnóstica y pronóstica útil en la evaluación de la fertilidad masculina.
- La tinción TB y AB fueron adecuadas para evaluar la integridad e inmadurez de la cromatina de los espermatozoides entre pacientes infértiles y donantes, pues las alteraciones anormales que se producen durante la configuración de la cromatina del espermatozoide o el intercambio de histonas a protaminas pueden provocar la fragmentación del ADN y por lo tanto, un aumento del DFI.

XI. Perspectivas

- Uso de biomarcadores no invasivos que predigan con precisión el resultado de la fertilización y para brindar información molecular sobre la fisiopatología subyacente de la infertilidad.
- Explorar nuevas herramientas de diagnóstico adicionales para facilitar la predicción de la fertilidad y las opciones de manejo directo de las parejas con infertilidad por factor masculino.
- Desarrollar nuevos enfoques de evaluación para la calidad de la cromatina espermática, incluida la composición de la nucleoproteína del espermatozoide, y su impacto en los resultados de ART.
- Incluir estudios de genómica, transcriptómica, proteómica, epigenómica y metabolómica en semen humano.
- Describir los valores umbral (de corte) e indicaciones para la prueba SDF y los criterios para interpretar los resultados del ensayo, además de estudios de cohortes para la validación de estos métodos en semen humano.

XII. Referencias

- Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Panner Selvam, M. K., Cho, C. L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosie, C., Parekh, N., Alves, M. G., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., Robert, K. A., ... Shah, R. (2020). Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *The world journal of men's health*, 38(4), 412–471.
- Akhavizadegan, H., Yamini, N., Musavi, A. M., Moradi, M., & Khatami, F. (2023). Sperm DNA Fragmentation Index in Abortion or *in Vitro* Fertilization Failure in Presence of Normal Semen Analysis. *Prague medical report*, 124(2), 166–171.
- Aladamat, N., & Tadi, P. (2022). Histology, Leydig Cells. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Arata, G., Osuna, J., Gómez, R & Regadera, J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática: Revisión. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 3(3), 12-19.
- Araujo, M. Pascual, E. Ortiz. A, Escobar. H. (2020). Eje hipotálamo hipofisario. Fisiología y patología, Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.
- Arteaga, S. & García M. (2021). Embriología humana y biología del desarrollo. 3ª Ed. Editorial Medica Panamericana.
- B, V. L., Stephen, S., Devaraj, R., Mithraprabhu, S., Bertolla, R. P., & Mahendran, T. (2020). Sperm chromatin structure assay versus sperm chromatin dispersion kits: Technical repeatability and choice of assisted reproductive technology procedure. *Clinical and*

experimental reproductive medicine, 47(4), 277–283.

Ballesca, J., Vazquez, M., Castillo, J., Jodar, Meritxell & Oliva, R. (2019). The Spermatozoa "A brief journey between the myth and the history of yesterday ..., to today's scienc. *Rev. Iberoam. Fert Rep Hum*, 2019; 36.

Bassiri, F., Nasr-Esfahani, M. H., Forozanfar, M., & Tavalae, M. (2020). Relationship between Sperm Parameters with Sperm Function Tests in Infertile Men with at Least One Failed Cycle after Intracytoplasmic Sperm Injection Cycle. *International journal of fertility & sterility*, 13(4), 324–329.

Bichara, C., Berby, B., Rives, A., Jumeau, F., Letailleur, M., Setif, V., Sibert, L., Rondanino, C., & Rives, N. (2019). Sperm chromatin condensation defects, but neither DNA fragmentation nor aneuploidy, are an independent predictor of clinical pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(7).

Boitrelle, F., Shah, R., Saleh, R., Henkel, R., Kandil, H., Chung, E., Vogiatzi, P., Zini, A., Arafa, M., & Agarwal, A. (2021). The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(12), 1368.

Bruce, M. C. (2019). Embriología humana y Biología del desarrollo. 6ª ed. Elsevier Health Sciences.

Bustos, E. & Torres, L. (2012). Reproducción Estacional en el Macho. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1266-1279.

Calogero, A. E., Cannarella, R., Agarwal, A., Hamoda, T. A. A., Rambhatla, A., Saleh, R., Boitrelle, F., Ziouziou, I., Toprak, T., Gul, M., Avidor-Reiss, T., Kavoussi, P., Chung,

- E., Birowo, P., Ghayda, R. A., Ko, E., Colpi, G., Dimitriadis, F., Russo, G. I., Martinez, M., ... Shah, R. (2023). The Renaissance of Male Infertility Management in the Golden Age of Andrology. *The world journal of men's health*, 41(2), 237–254.
- Campos, L. G. A., Requejo, L. C., Miñano, C. A. R., Orrego, J. D., Loyaga, E. C., & Cornejo, L. G. (2021). Correlation between sperm DNA fragmentation index and semen parameters in 418 men seen at a fertility center. *JBRA assisted reproduction*, 25(3), 349–357.
- Candela, L., Boeri, L., Capogrosso, P., Cazzaniga, W., Pozzi, E., Belladelli, F., Baudo, A., Ravizzoli, A., Ventimiglia, E., Viganò, P., Alfano, M., Abbate, C., Cornelius, J., Mattei, A., Montorsi, F., & Salonia, A. (2021). Correlation among isolated teratozoospermia, sperm DNA fragmentation and markers of systemic inflammation in primary infertile men. *PloS one*, 16(6), e0251608.
- Cánovas, I., Cadenas, V., Molina, R., Fernández, J., Sánchez, A., & García, J. (2008). Relación entre la edad del varón y la calidad del estudio seminal: Experiencia en el área sanitaria 14 de la agencia valenciana de la salud. *Archivos Españoles de Urología* (Ed. impresa), 61(6), 705-710.
- Champroux, A., Torres-Carreira, J., Gharagozloo, P., Drevet, J. R., & Kocer, A. (2016). Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic and clinical andrology*, 26, 17.
- Chereshnev, V. A., Pichugova, S. V., Beikin, Y. B., Chereshneva, M. V., Iukhta, A. I., Stroevev, Y. I., & Churilov, L. P. (2021). Pathogenesis of Autoimmune Male Infertility: Juxtacrine, Paracrine, and Endocrine Dysregulation. *Pathophysiology: the official*

- journal of the International Society for Pathophysiology*, 28(4), 471–488.
- Cissen, M., Wely, M. V., Scholten, I., Mansell, S., Bruin, J. P., Mol, B. W., Braat, D., Repping, S., & Hamer, G. (2016). Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*, 11(11), e0165125.
- Clift, D. & Schuh, M. (2013). Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 14(9), 549–562.
- Cobb M. (2012). An Incredible 10 Years: The Discovery of the Egg and Sperm in the 17th Century. *Domestic Animal Reproduction = Zuchthygiene*, 47 Supplement 4, 2–6.
- Colaco, S., & Sakkas, D. (2018). Paternal factors contributing to embryo quality. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(11), 1953–1968.
- de la Iglesia, A., Jodar, M., Oliva, R., & Castillo, J. (2023). Insights into the sperm chromatin and implications for male infertility from a protein perspective. *WIREs mechanisms of disease*, 15(2), e1588.
- Di Guardo, F., Vloeberghs, V., Bardhi, E., Blockeel, C., Verheyen, G., Tournaye, H., & Drakopoulos, P. (2020). Low Testosterone and Semen Parameters in Male Partners of Infertile Couples Undergoing IVF with a Total Sperm Count Greater than 5 Million. *Journal of clinical medicine*, 9(12), 3824.
- Dupont, C., Faure, C., Sermondade, N., Boubaya, M., Eustache, F., Clément, P., Briot, P., Berthaut, I., Levy, V., Cedrin-Durnerin, I., Benzacken, B., Chavatte-Palmer, P., & Levy, R. (2013). Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian journal of andrology*, 15(5), 622–625.

- Dutta, S., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2019). Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab journal of urology*, *17*(2), 87–97.
- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., Sharma, R., & Humaidan, P. (2021). Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, *53*(2), e13874.
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2005). Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicology and applied pharmacology*, *207*(2 Suppl), 532–537.
- Evenson, D. P., Larson, K. L., & Jost, L. K. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of andrology*, *23*(1), 25–43.
- Fainberg, J., & Kashanian, J. A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research*, *8*, F1000 Faculty Rev-670.
- Farkouh, A., Salvio, G., Kuroda, S., Saleh, R., Vogiatzi, P., & Agarwal, A. (2022). Sperm DNA integrity and male infertility: a narrative review and guide for the reproductive physicians. *Translational andrology and urology*, *11*(7), 1023–1044.
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*, *24*(1), 59–66.
- Ferrigno, A., Ruvolo, G., Capra, G., Serra, N., & Bosco, L. (2021). Correlation between the DNA fragmentation index (DFI) and sperm morphology of infertile patients. *Journal of*

assisted reproduction and genetics, 38(4), 979–986.

Gerton, J. L., & Hawley, R. S. (2005). Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nature reviews. Genetics*, 6(6), 477–487.

He, Z., Kokkinaki, M., & Dym, M. (2009). Signaling molecules and pathways regulating the fate of spermatogonial stem cells. *Microscopy research and technique*, 72(8), 586–595.

Hofmann M. C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Molecular and cellular endocrinology*, 288(1-2), 95–103.

Jafari, H., Mirzainajmabadi, K., Roudsari, R. L., & Rakhshkhorshid, M. (2021). The factors affecting male infertility: A systematic review. *International journal of reproductive biomedicine*, 19(8), 681–688.

Javed, A., Talkad, M. S., & Ramaiah, M. K. (2019). Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 46(1), 14–21.

Kandil, H., Agarwal, A., Saleh, R., Boitrelle, F., Arafa, M., Vogiatzi, P., Henkel, R., Zini, A., & Shah, R. (2021). Editorial Commentary on Draft of World Health Organization Sixth Edition Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *The world journal of men's health*, 39(4), 577–580.

Kim, H. S., Kang, M. J., Kim, S. A., Oh, S. K., Kim, H., Ku, S. Y., Kim, S. H., Moon, S. Y., & Choi, Y. M. (2013). The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 40(1), 23–28.

- Krzastek, S. C., Farhi, J., Gray, M., & Smith, R. P. (2020). Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. *Translational andrology and urology*, 9(6), 2797–2813.
- Kubota, H., & Brinster, R. L. (2018). Spermatogonial stem cells. *Biology of reproduction*, 99(1), 52–74.
- Kuchta, M., Andraszek, K., Szeleszczuk, O., Niedbała, P & Otwinowska, A. (2020). Analysis of sperm chromatin structure in blue foxes (*Alopex lagopus*) and silver foxes (*Vulpes vulpes*), *Livestock Science*. 103869, ISSN 1871-1413.
- Küçük N. (2018). Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm. *Turkish journal of urology*, 44(1), 1–5.
- Kumar, R. S., Sharma, S., Halder, A., & Gupta, V. (2023). Deep Learning-Based Robust Automated System for Predicting Human Sperm DNA Fragmentation Index. *Journal of human reproductive sciences*, 16(1), 16–21.
- Lara, S., Ribas, J., Rosado, C., Lacruz, T., Benet, J. & García, A. (2021). Sperm selection during ICSI treatments reduces single- but not double-strand DNA break values compared to the semen sample. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(5), 1187–1196.
- Larose, H., Shami, A. N., Abbott, H., Manske, G., Lei, L., & Hammoud, S. S. (2019). Gametogenesis: A journey from inception to conception. *Current Issues in Developmental Biology*, 132, 257-310.
- Le, M. T., Nguyen, T. A. T., Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, V. T., Le, D. D., Nguyen, V. Q. H., & Cao, N. T. (2019). Does sperm DNA fragmentation correlate with

semen parameters?. *Reproductive medicine and biology*, 18(4), 390–396.

Li, N., Zhang, C., Wang, Z., Zhang, Q., Chen, R., Hua, Z., Zhao, S., Shen, H., Chang, G., & Wan, W. (2022). Clinical study of Wuwei Fuzheng Yijing formula in the treatment of sperm DNA damage in male infertility: A study protocol for a randomized controlled trial. *Medicine*, 101(43), e31226.

Liu, K., Mao, X., Pan, F., Chen, Y., & An, R. (2023). Correlation analysis of sperm DNA fragmentation index with semen parameters and the effect of sperm DFI on outcomes of ART. *Scientific reports*, 13(1), 2717.

Lourenço, M. L., Moura, G. A., Rocha, Y. M., Rodrigues, J. P. V., & Monteiro, P. B. (2023). Impact of sperm DNA fragmentation on the clinical outcome of assisted reproduction techniques: a systematic review of the last five years. *JBRA assisted reproduction*, 27(2), 282–291.

Luque, R. (2021). *Introducción a la anatomía*. Universidad del Rosario.

Machorro, L., Alba, L., Paredes, J., Monsalve, C., Valdez, F., & Valdés, A. (2018). Evaluación de la integridad del ADN espermático y su repercusión en los parámetros seminales de varones infértiles. *Ginecología y obstetricia de México*, 86(11), 699-708.

Malo, A. F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A. J. & Roldán, E. R. (2006). Sperm design and sperm function. *Biology Letters*, 2(2), 246–249.

Manotas, M. C., González, D. M., Céspedes, C., Forero, C., & Rojas Moreno, A. P. (2022). Genetic and Epigenetic Control of Puberty. *Sexual development: genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 16(1), 1–10.

- Marinaro, J. A., & Schlegel, P. N. (2023). Sperm DNA Damage and Its Relevance in Fertility Treatment: A Review of Recent Literature and Current Practice Guidelines. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 1446.
- Megías M, Molist P & Pombal MA. (2019). Atlas de histología vegetal y animal.
- Moore, K., Persaud, T & Torchia, M. (2020). Embriología clínica. 11^a ed. Elsevier Health Sciences.
- Moritz, L., & Hammoud, S. S. (2022). The Art of Packaging the Sperm Genome: Molecular and Structural Basis of the Histone-To-Protamine Exchange. *Frontiers in endocrinology*, 13, 895502.
- Mundt, N., Kenzler, L., & Spehr, M. (2022). Purinergic Signaling in Spermatogenesis. *Frontiers in endocrinology*, 13, 867011.
- Okada Y. (2022). Sperm chromatin structure: Insights from in vitro to in situ experiments. *Current opinion in cell biology*, 75, 102075.
- Okubo, T., Onda, N., Hayashi, T., Kobayashi, T., Omi, K., & Segawa, T. (2023). Performing a sperm DNA fragmentation test in addition to semen examination based on the WHO criteria can be a more accurate diagnosis of IVF outcomes. *BMC urology*, 23(1), 78.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19 (4), 426-436.
- Padda, J., Khalid, K., Moosa, A., Syam, M., Kakani, V., Imdad, U., Ismail, D., Cooper, A. C., & Jean-Charles, G. (2021). Role of Kisspeptin on Hypothalamic-Pituitary-Gonadal

Pathology and Its Effect on Reproduction. *Cureus*, 13(8), e17600.

Pakpahan, C., Ibrahim, R., William, W., Kandar, P. S., Darmadi, D., Khaerana, A. S. A., & Supardi, S. (2023). "Am I Masculine?" A metasynthesis of qualitative studies on traditional masculinity on infertility. *F1000Research*, 12, 252.

Panner Selvam, M. K., & Agarwal, A. (2018). A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. *Arab journal of urology*, 16(1), 65–76.

Patel, A. S., Leong, J. Y., & Ramasamy, R. (2017). Prediction of male infertility by the World Health Organization laboratory manual for assessment of semen analysis: A systematic review. *Arab journal of urology*, 16(1), 96–102.

Phillips, B. T., Gassei, K., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1546), 1663–1678.

Pino, V., Sanz, A., Valdés, N., Crosby, J., & Mackenna, A. (2020). The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *JBRA assisted reproduction*, 24(1), 82–86.

Pourmasumi, S., Khoradmehr, A., Rahiminia, T., Sabeti, P., Talebi, A. R., & Ghasemzadeh, J. (2019a). Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. *Journal of reproduction & infertility*, 20(2), 95–101.

Pourmasumi, S., Nazari, A., Fagheirelahee, N., & Sabeti, P. (2019b). Cytochemical tests to investigate sperm DNA damage: Assessment and review. *Journal of family medicine*

and primary care, 8(5), 1533–1539.

Pourmasumi, S., Sabeti, P., Rahiminia, T., Mangoli, E., Tabibnejad, N., & Talebi, A. R. (2017). The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *International journal of reproductive biomedicine*, 15(6), 331–344.

Qiu, Y., Yang, H., Li, C., & Xu, C. (2020). Progress in Research on Sperm DNA Fragmentation. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 26, e918746.

Ramaswamy, S., & Weinbauer, G. F. (2015). Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*, 4(2), e996025.

Recchia, K., Jorge, A. S., Pessôa, L. V. F., Botigelli, R. C., Zugaib, V. C., de Souza, A. F., Martins, D. D. S., Ambrósio, C. E., Bressan, F. F., & Pieri, N. C. G. (2021). Actions and Roles of FSH in Germinative Cells. *International journal of molecular sciences*, 22(18), 10110.

Ribas-Maynou, J., Novo, S., Torres, M., Salas-Huetos, A., Rovira, S., Antich, M., & Yeste, M. (2022). Sperm DNA integrity does play a crucial role for embryo development after ICSI, notably when good-quality oocytes from young donors are used. *Biological research*, 55(1), 41.

Riffat, B., Sarwat, J., Salma, K., Suhuail, R., Tayyaba, A., Ali, A., Mashal, K., Mohammad, E., & Houda, A. (2023). Analysis of sperm chromatin packaging and reproductive biomarker to evaluate the consequence of advanced male age. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1092603.

Roberts, M., & Jarvi, K. (2009). Steps in the investigation and management of low semen

- volume in the infertile man. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada*, 3(6), 479–485.
- Sadeghi M. R. (2021). The Possibility of Increasing Oocyte Capacity to Repair Sperm DNA Fragmentation. *Journal of reproduction & infertility*, 22(2), 75–76.
- Sen, A., & Hoffmann, H. M. (2020). Role of core circadian clock genes in hormone release and target tissue sensitivity in the reproductive axis. *Molecular and cellular endocrinology*, 501, 110655.
- Sengupta, P., Dutta, S., Karkada, I. R., & Chinni, S. V. (2021). Endocrinopathies and Male Infertility. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(1), 10.
- Sharma, A., Minhas, S., Dhillon, W. S., & Jayasena, C. N. (2021). Male infertility due to testicular disorders. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 106(2), e442–e459.
- Siu, K. K., Serrão, V. H. B., Ziyat, A., & Lee, J. E. (2021). The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. *The Journal of cell biology*, 220(10), e202102146.
- Szabó, A., Vánca, S., Hegyi, P., Váradi, A., Forintos, A., Filipov, T., Ács, J., Ács, N., Szarvas, T., Nyirády, P., & Kopa, Z. (2023). Lifestyle-, environmental-, and additional health factors associated with an increased sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 21(1), 5.
- Talebi, A. R., Vahidi, S., Aflatoonian, A., Ghasemi, N., Ghasemzadeh, J., Firoozabadi, R. D., & Moein, M. R. (2012). Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia*, 44 Suppl 1, 462–470.

- Teves, M. E., & Roldan, E. R. S. (2022). Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiological reviews*, 102(1), 7–60.
- Tímermans, A., Vázquez, R., Otero, F., Gosálvez, J., Johnston, S., & Fernández, J. L. (2020). DNA fragmentation of human spermatozoa: Simple assessment of single- and double-strand DNA breaks and their respective dynamic behavioral response. *Andrology*, 8(5), 1287–1303.
- Traini, G., Tamburrino, L., Vignozzi, L., Baldi, E., & Marchiani, S. (2022). Is oxidative stress evaluated in viable human spermatozoa a marker of good semen quality?. *Frontiers in endocrinology*, 13, 1012416.
- Wong, W. J., & Khan, Y. S. (2022). Histology, Sertoli Cell. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- World Health Organization. (2021). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. Geneva: World Health Organization; 2021:119–24.
- Yu, X., Zhang, X., & Wang, Q. (2022). Sexual dysfunction is more common among men who have high sperm DNA fragmentation or teratozoopermia. *Scientific reports*, 12(1), 22427.
- Zakrzewski, P., Lenartowska, M., & Buss, F. (2021). Diverse functions of myosin VI in spermiogenesis. *Histochemistry and cell biology*, 155(3), 323–340.
- Zhang, H., Zhu, F. Y., He, X. J., Tang, S. H., Long, T., Peng, L., Zhang, H. M., Zou, Z. Z., Xiong, Z., & Zhang, X. P. (2023). The influence and mechanistic action of sperm DNA fragmentation index on the outcomes of assisted reproduction technology. *Open life sciences*, 18(1), 20220597.

- Zhu, C., Zhang, S., Chen, F., She, H., Ju, Y., Wen, X., Ji, Y., Pan, Y., Yang, C., Sun, Y., Dong, N., Liu, K., Li, F., Xue, T., & Cui, H. (2022). Correlations between elevated basal sperm DNA fragmentation and the clinical outcomes in women undergoing IUI. *Frontiers in endocrinology*, *13*, 987812.
- Zini, A., & Libman, J. (2006). Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Current opinion in urology*, *16*(6), 428–434.

XIII. Anexo

13.1 Dictamen del comité hospitalario de bioética



COMITÉ HOSPITALARIO DE BIOETICA

Ciudad de México a 24 de Mayo de 2021

M en C Pedro Cuapio Padilla.

Investigador Principal

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ HOSPITALARIO DE BIOETICA.

(COMBIOETICA09CHB10620171023)

Resultado: APROBACIÓN.

Título del Proyecto: Correlación de la madurez de la cromatina, estrés oxidante, fragmentación de ADN y mRNAs con las tasas de fertilización, desarrollo embrionario, formación de blastocisto, tasa de embarazo y recién nacidos vivos en varones infértiles sometidos a técnicas de reproducción asistida.

Código asignado por el Comité: HISPCHB21-01

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
PROTOCOLO	2 / 22 de Mayo de 2021	Aprobado
CONSENTIMIENTO INFORMADO	2 / 22 de Mayo de 2021	Aprobado

COMITÉ HOSPITALARIO DE BIOÉTICA

DICTAMEN DE APROBACIÓN (Parte posterior de la carta de aprobación)

El formato de carta de aprobación aparece en la siguiente página

LINEAMIENTOS QUE ESTABLECEN LAS OBLIGACIONES DE LOS INVESTIGADORES RESPONSABLES DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

1. Contar con la versión actualizada, con firma de aprobado por el Comité de la Clínica del protocolo de investigación, carta de consentimiento informado y cualquier documento que se haya presentado a revisión y hubiese sido aprobado.
2. Incluir en el expediente del paciente el "**Consentimiento informado para análisis de muestras de semen en fresco para procedimientos de reproducción asistida y protocolo de investigación**". El cual deberá estar firmado por los pacientes, responsable del protocolo y director médico de la clínica.
3. El investigador deberá reportar de manera semestral (junio y diciembre) el avance de su proyecto, el cual lo hará llegar al Comité de Ética de la Clínica o una carta describiendo los avances del proyecto.
4. Al terminar el proyecto enviar al Comité un reporte final del estudio en los 2 meses siguientes a su terminación o una carta describiendo los resultados del proyecto).
5. En caso de que del proyecto de investigación sirva para la colaboración con trabajos ó proyectos de investigación de Institutos de Salud, Posgrados y con la participación de distintos profesionales, se deberá anexar la documentación oficial tanto del proyecto como la documentación de los profesionales que participaran (carta presentación, documento emitido, título, cédula, historia académica, credencial, carta aceptación, etc).
6. La información de los pacientes se mantendrá de forma confidencial y los datos se analizaran de forma que quede protegida la identidad de los pacientes.
7. Los resultados de los estudios emanados del protocolo de investigación podrán ser expuestos a los profesionales del área de biología de la reproducción en los diversos foros (congresos, seminarios, titulaciones, posgrados, diplomados tanto nacionales como internacionales) ya que informaran sobre los avances en la evaluación del gameto masculino en la reproducción humana asistida.
8. Todo el avance del proyecto, reporte final, colaboraciones y documentos que de él emanen, quedara bajo resguardo en las instalaciones de la clínica de reproducción asistida Hisparep, Hospital Español de la Ciudad de México.




COMITÉ HOSPITALARIO DE BIOETICA

Este protocolo tiene vigencia de Agosto de 2021 a Agosto de 2025.


En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. Lo anterior forma parte de las obligaciones del investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

Atentamente




Dr. Sergio Téllez Velasco


Presidente del Comité



Lic. Dosiñda Vales Domínguez
Vocal secretaria del Comité



Lic. Héctor Marcelino Flores Hidalgo
Vocal del Comité



Psic. Rebeca Millán Delgadillo
Vocal del Comité

13.2 Consentimiento informado



Consentimiento informado para análisis de muestras de semen en fresco para procedimientos de reproducción asistida y protocolo de investigación

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ANALISIS DE MUESTRAS DE SEMEN EN FRESCO PARA PROCEDIMIENTOS DE REPRODUCCION ASISTIDA Y PROTOCOLO DE INVESTIGACION

Fecha: _____

Sr. (nombre y dos apellidos) _____

DE _____ AÑOS DE EDAD, CURP _____

Y DOMICILIO EN _____

No Telefónico Casa: _____

No. Telefónico celular: _____

E-mail: _____

Debido a las circunstancias en las que me encuentro (tratamiento médico de reproducción humana asistida).

Sra. (nombre y dos apellidos) _____

DE _____ AÑOS DE EDAD, CURP _____

Y DOMICILIO EN _____

No Telefónico Casa: _____

No. Telefónico celular: _____

E-mail: _____

A los fines citados, he sido informado de las siguientes disposiciones sobre Técnicas de Reproducción Asistida:

1. Se procederá al análisis de semen de muestra de semen fresco, previamente obtenida por el paciente.
2. La muestra de semen, se procesará utilizando los criterios del Manual de la OMS 2010, dependiendo de las características de la muestra en fresco; este resultado podrá orientar a qué tipo de procedimiento de reproducción humana asistida se podría realizar de acuerdo a lo que acordaron con el área médica.

Consentimiento informado para análisis de muestras de semen en fresco para procedimientos de reproducción asistida y protocolo de investigación

3. Por ello autorizo al personal del laboratorio de andrología para realizar el análisis de mi muestra en fresco.
4. Se me ha informado los porcentajes de éxito de las técnicas de reproducción asistida por parte del área médica.
5. Cualquier duda del procedimiento de reproducción se me ha aclarado oportunamente.
6. La infertilidad masculina se ha incrementado en los últimos años, es por eso la necesidad de realizar más estudios y pruebas especiales para determinar la calidad del gameto masculino (espermatozoide).
7. La muestra una vez utilizada para el procedimiento de reproducción humana asistida (análisis seminal, técnicas de selección y capacitación espermática) será evaluada con las técnicas de estabilidad de la cromatina, maduración espermática, stress oxidativo, fragmentación de ADN y mRNAs, que son parte del proyecto "Correlación de la madurez de la cromatina, estrés oxidante, fragmentación de ADN y mRNAs con las tasas de fertilización, desarrollo embrionario, formación de blastocisto, tasa de embarazo y recién nacidos vivos en varones infértiles sometidos a técnicas de reproducción asistida". Con esto, se tendrá más información del gameto masculino, por ende evaluar con mayor detalle su calidad y poder incrementar en lo posible las tasas de éxito en los procedimientos de reproducción humana asistida.
8. La información se maneja de forma confidencial, de manera que quedan protegidos los datos personales de los pacientes.
9. Estos estudio no ponen en riesgo alguno los procedimientos de reproducción asistida ya que la muestra que se analizara será la que no se ocupe en los procedimientos.
10. Los resultados permitirán tener mayor información del gameto masculino y dar pauta a que estudio nuevos se pueden implementar previos a los procedimientos de reproducción humana asistida y tener mayor información para mejorar los resultados.
11. Por ello autorizo a que mi muestra pueda ser utilizada y evaluada para los estudios antes mencionados



Consentimiento informado para análisis de muestras de semen en fresco para procedimientos de reproducción asistida y protocolo de investigación

Autorización:

Autorizo al personal del laboratorio de andrología a procesar mi muestra de semen en fresco para el procedimiento de reproducción y posteriormente ser evaluada para los estudios del proyecto mencionados en el punto 7.

En _____, a _____ de _____ de _____

Paciente
Firma

Cónyuge
Firma

M en C Pedro Cuapio Padilla

Responsable del Protocolo
Firma

Dr Jorge Luis Lezama Ruvalcaba

Director Medico Clínica Hisparep
Firma

Dr. Carlos Gerardo Salazar López Ortiz

Director General Clínica Hisparep
Firma

58 CONGRESO
DE
LA ANUAL
ASOCIACIÓN MEXICANA
DE MEDICINA DE LA
REPRODUCCIÓN



Mérida Yucatán 2022
del 20 al 23 de Julio

Otorga la presente

CONSTANCIA

al **Dr. Mario Alberto Quintero Ramírez**

Por haber obtenido el **SEGUNDO LUGAR** en presentación **CARTEL**, como Autor del trabajo libre titulado:

Evaluación de la fragmentación del ADN en espermatozoides de pacientes infértiles.

Dr. Víctor Alfonso Beiza Reséndiz
Presidente

Dr. Álvaro Santibáñez Morales
Vicepresidente

Dr. Luis Miguel Bedia Sánchez
Secretario



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00116

Matrícula: 2203801603

Evaluación del daño al ADN y condensación de la cromatina en muestras seminales de pacientes infértiles.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 8 del mes de noviembre del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA
DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
DR. RODOLFO CANSECO SEDANO
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO



MARIO ALBERTO QUINTERO RAMIREZ
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: MARIO ALBERTO QUINTERO RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

VOGAL

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOGAL

DR. RODOLFO CANSECO SEDANO

SECRETARIO

DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO