

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL, DAÑO AL DNA ESPERMÁTICO Y  
SU RELACIÓN EN LA FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO (DÍA 2) EN  
PACIENTES CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS.**

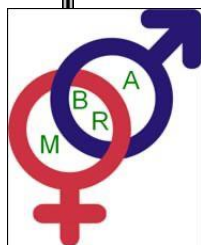
**T E S I S**

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

**PRESENTA:  
REBECA AVELLANEDA REAL**

**CO-DIRECTORES:  
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA  
DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ**

**ASESOR:  
DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA**



**CIUDAD DE MÉXICO  
FEBRERO, 2023**

**MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES** (Nombre, adscripción y correo electrónico):

1. M. en C. Pedro Cuapio Padilla, responsable del Laboratorio de Andrología, Banco de Semen, Calidad e investigación, HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español. Ciudad de México.

2. Dr. Edmundo Bonilla González, Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

3. Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura. Departamento de Biología de la Reproducción, CBS. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. [pgdm@xanum.uam.mx](mailto:pgdm@xanum.uam.mx)

**JURADO DE EXAMEN** (Nombre, adscripción y correo electrónico):

1. Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura. Departamento de Biología de la Reproducción. CBS. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. [pgdm@xanum.uam.mx](mailto:pgdm@xanum.uam.mx)

2. Dr. José Miguel Betancourt Rule. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. [bet@xanum.uam.mx](mailto:bet@xanum.uam.mx)

3. Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana. Laboratorio de Andrología. Departamento de Ciencias de la Salud. CBS. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. [reyna@xanum.uam.mx](mailto:reyna@xanum.uam.mx)

4. Dr. Rodolfo Canseco Sedano. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, Universidad Veracruzana. [rcanseco@uv.mx](mailto:rcanseco@uv.mx)

**AGRADACIMIENTOS:**

**A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA. A CONACYT POR EL APOYO DE LA BECA CON REGISTRO DE LA MAESTRÍA DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL (CONACYT 003797). A LA CLÍNICAL DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (HISPAREP) DEL HOSPITAL ESPAÑOL.**

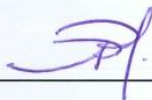
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo Firmantes, aprobaron la tesis titulada “Determinación de la Calidad Seminal, Daño al DNA Espermático y su Relación en la Fecundación y Desarrollo Embrionario (Día 2) en pacientes con Problemas Reproductivos” con fecha 13 de febrero del 2023.

### SINODALES



PRESIDENTE

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE



SECRETARIO

DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA



VOCAL

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA



VOCAL

DR. RODOLFO CANSECO SEDANO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
1.1 APARATO REPRODUCTOR MASCULINO .....	10
1.2 ESTEROIDOGÉNESIS .....	10
1.3 REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS POR EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TESTÍCULO (HPT) .....	11
1.4 ESPERMATOGÉNESIS .....	12
1.4.1 <i>Espermiogénesis</i> .....	14
1.4.2 <i>Intercambio de histonas por protaminas</i> .....	16
1.4.3 <i>Maduración en el epidídimo</i> .....	18
1.5 ESPERMATOZOIDES .....	19
<b>2. INFERTILIDAD</b> .....	<b>20</b>
2.1 CAUSAS INTRÍNSECAS DE LA INFERTILIDAD .....	21
2.1.1 <i>Hipogonadismo</i> .....	22
2.1.2 <i>Varicocele</i> .....	23
2.1.3 <i>Daño al DNA (fragmentación)</i> .....	23
2.2 CAUSAS EXTRÍNSECAS DE LA INFERTILIDAD .....	24
<b>3. CALIDAD SEMINAL</b> .....	<b>25</b>
3.1 EFECTO DEL PH SOBRE LA CALIDAD SEMINAL .....	25
3.2 EFECTO DE LA VISCOSIDAD SOBRE LA CALIDAD SEMINAL .....	25
3.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) .....	26
<b>4. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE DAÑO AL DNA</b> .....	<b>26</b>
<b>5. ANTECEDENTES</b> .....	<b>28</b>
<b>6. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>7. HIPÓTESIS</b> .....	<b>31</b>
<b>8. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
8.1 OBJETIVO GENERAL .....	31
8.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	32
<b>9. MÉTODO</b> .....	<b>32</b>
9.1 DISEÑO DEL ESTUDIO .....	32
9.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN .....	33
9.3 COMITÉ DE BIOÉTICA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	33
9.4 ANÁLISIS DE SEMEN (OMS 2021) .....	34
9.5 TÉCNICA DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD) ESPERMÁTICA (MUESTRA EN FRESCO) .....	34
9.6 TÉCNICAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA .....	35
9.6.1 <i>Lavado</i> .....	35

9.6.2 Gradientes de Densidad.....	36
9.6.3 Swim-up.....	36
9.7 TÉCNICA DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD) (MUESTRA RECUPERADA) .....	36
9.8 PREPARACIÓN DE LOS OVOCITOS POR PARTE DEL EMBRIÓLOGO .....	37
9.10 DESARROLLO EMBRIONARIO .....	38
9.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
<b>10. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>11. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
11.1 CONCLUSIONES.....	45
<b>12. ANEXO .....</b>	<b>47</b>
<b>13. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>49</b>

## Resumen

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad como la incapacidad de una pareja de concebir un bebé a lo largo de un año de haber tenido relaciones sexuales sin protección. En México se establece que el 17% de la población en la edad reproductiva presenta algún trastorno relacionado con la infertilidad. El objetivo de este trabajo es evaluar la calidad seminal y la fragmentación del DNA espermático en muestras de donantes para comparar con pacientes infértiles y su impacto en la fecundación y desarrollo embrionario. El semen de 41 donantes y 52 pacientes infértiles fue analizado de acuerdo con lineamientos del manual de la OMS (2021) y se llevaron a cabo ciclos de fertilización *in vitro* utilizando inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI), en total fueron inyectados 400 ovocitos, los cuales fueron evaluados hasta el día dos de desarrollo. En las muestras de espermatozoides utilizados en este estudio se cuantificó por el índice de fragmentación del DNA (DFI) que se analizó mediante la técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD). RESULTADOS: El porcentaje de DFI en fresco y post-capacitación fue mayor en los pacientes que en los donantes con diferencias significativas. Sumando a esto, existe una **correlación positiva** entre el índice de fragmentación (DIF) con el porcentaje de espermatozoides inmóviles con diferencias significativas en comparación con los donantes. Mientras que la tasa de fecundación fue de un 66% en los donantes y 76% en los pacientes. Además, la tasa de fecundación se **correlaciona positivamente** con la concentración, espermatozoides móviles progresivos, totales móviles progresivos, porcentaje de móviles no progresivos y formas normales, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las correlaciones de estos datos. Estos resultados muestran la importancia de evaluar el DFI de los espermatozoides rutinariamente, así como realizar las técnicas de selección espermática, ya que se ha demostrado que se logra seleccionar espermatozoides con un DFI bajo, teniendo así el mejor espermatozoide que se usará para el procedimiento de ICSI.



## Abstract

The World Health Organization (WHO) defines infertility as a disease of the reproductive tract manifested by the inability of a male or female to achieve a pregnancy after one year of regular unprotected sexual intercourse (World Health Organization, 2021). As for Mexico, 17% of the population of reproductive age suffers from a reproductive failure associated with infertility. The objective of this research is to evaluate semen samples from donors and patients diagnosed with infertility by analyzing semen quality parameters as well as sperm DNA fragmentation and its impact on fertilization and embryonic development. The semen of 41 donors and 52 infertile patients was analyzed according to guidelines detailed in the WHO (Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 6<sup>th</sup> edition, 2021). Subsequently, *in vitro* fertilization cycles were carried out using intracytoplasmic sperm injection (ICSI). 400 oocytes were injected, which were then evaluated until day two of embryonic development (presence of four blastomeres). DNA fragmentation was determined using the sperm chromatin dispersion (SCD) test. The DNA fragmentation index (DFI) of fresh and post-capacitation DFI was higher in patients than in donors with the former having significant statistical differences. There is a **positive correlation** between the DFI with the percentage of immotile sperm with a significant statistical difference in donors. The fertilization rate (%) of ICSI was 66% in donors and 76% in patients. The correlation between the fertilization rate (%) is positively correlated with the concentration, percentages in sperm progressive motility, total progressive motility, non-progressive motility, and normal forms, although there were no significant statistical differences. The results presented here highlight the importance of evaluating DNA fragmentation as well as an adequate sperm selection according to the sperm quality and individuality of each sample, thereby obtaining the best sperm (low DFI) for ICSI and thus optimizing the fertilization rate and embryo quality.

# 1. Introducción

## 1.1 Aparato Reproductor Masculino

El aparato reproductor masculino se compone de un par de testículos que se comunican mediante los conductos eferentes al epidídimo, en cuyo extremo posterior se unen a los conductos deferentes que pueden presentar un ensanchamiento o ampolla y posteriormente unirse al conducto eyaculador que se continúa con la uretra que recorre la longitud del pene, estructura que corresponde al órgano copulador. Asociadas al aparato reproductor, se encuentran las glándulas como próstata, de Littré y de Cowper que proporcionan material viscoso y mucoso que al unirse a los espermatozoides constituyen el líquido seminal (Boone, 1989; Weichert, 1986).

Dentro de los túbulos seminíferos se encuentran varios tipos de células: espermatogonias, que son células germinales; que dan origen a los espermatocitos, estos a las espermátides, que a su vez generan a los espermatozoides. También pueden encontrarse células somáticas como las células de Sertoli, que se encargan de nutrir a los espermatozoides en desarrollo, así como secretar una variedad de sustancias hacia el torrente sanguíneo y hacia la luz de los túbulos seminíferos (Esteves, 2019; Goodman, 2009). Estos últimos están rodeados por varias capas de células epiteliales mioideas peritubulares, que son contráctiles y ayudan a impulsar los espermatozoides inmóviles a través de los túbulos para dirigirlos hacia la *rete testis* (Goodman, 2009). Otro tipo de células importantes son las células de Leydig, que son un componente importante del estroma testicular; las células de Leydig se encargan de la síntesis de la hormona esteroide testosterona (T), quien dirige la maduración y proliferación de las espermatogonias dentro de los túbulos seminíferos (Zhou, et al., 2019).

## 1.2 Esteroidogénesis

La síntesis y secreción de hormonas es importante para el mantenimiento y maduración de los gametos. Para ello, se requiere de dos tipos de hormonas, las glucoproteínicas y esteroideogénicas. Las hormonas glucoproteínicas son liberadas al torrente sanguíneo por la hipófisis anterior por medio de secreciones pulsátiles de la hormona Folículo Estimulante (FSH, Follicle Stimulating Hormone) y la hormona Luteinizante (LH, Luteinizing Hormone) (Dufau, 1998; Flück & Pandey, 2017; Shpakov, et al., 2020). La esteroideogénesis de los andrógenos involucra la síntesis *de novo* a partir del colesterol en los testículos proceso que se activa a la unión de la LH al a su receptor de membrana (LHR, Luteinizing Hormone Receptor) acoplado a la proteína específica reguladora de nucleótidos de guanina (proteína G) en la membrana de la célula de Leydig, ubicadas en el espacio intersticial del túbulo seminífero. En la transducción de señales, la LHR interacciona principalmente con la proteína Gs y de forma variable con la proteína Gq/11 y Gi. Las proteínas Gq dependen de enzimas de la familia de fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés: *Phospholipase C*) mientras que las proteínas Gs y Gi promueven e inhiben (respectivamente) la activación de la adenilato-ciclasa (AC) y por consecuencia la cantidad de adenosina 3'5' monofosfato citosólico cíclico (cAMP, cyclic adenosine 3'5'monophosphate) (Dufau, 1998; Shpakov, et al., 2020). El cAMP participa en la fosforilación de proteínas específicas para liberar el colesterol desde sus depósitos celulares en el citosol para ser translocado hacia el espacio intermembranal de la mitocondria (Hinson, et al., 2010) y así promover la síntesis de T.

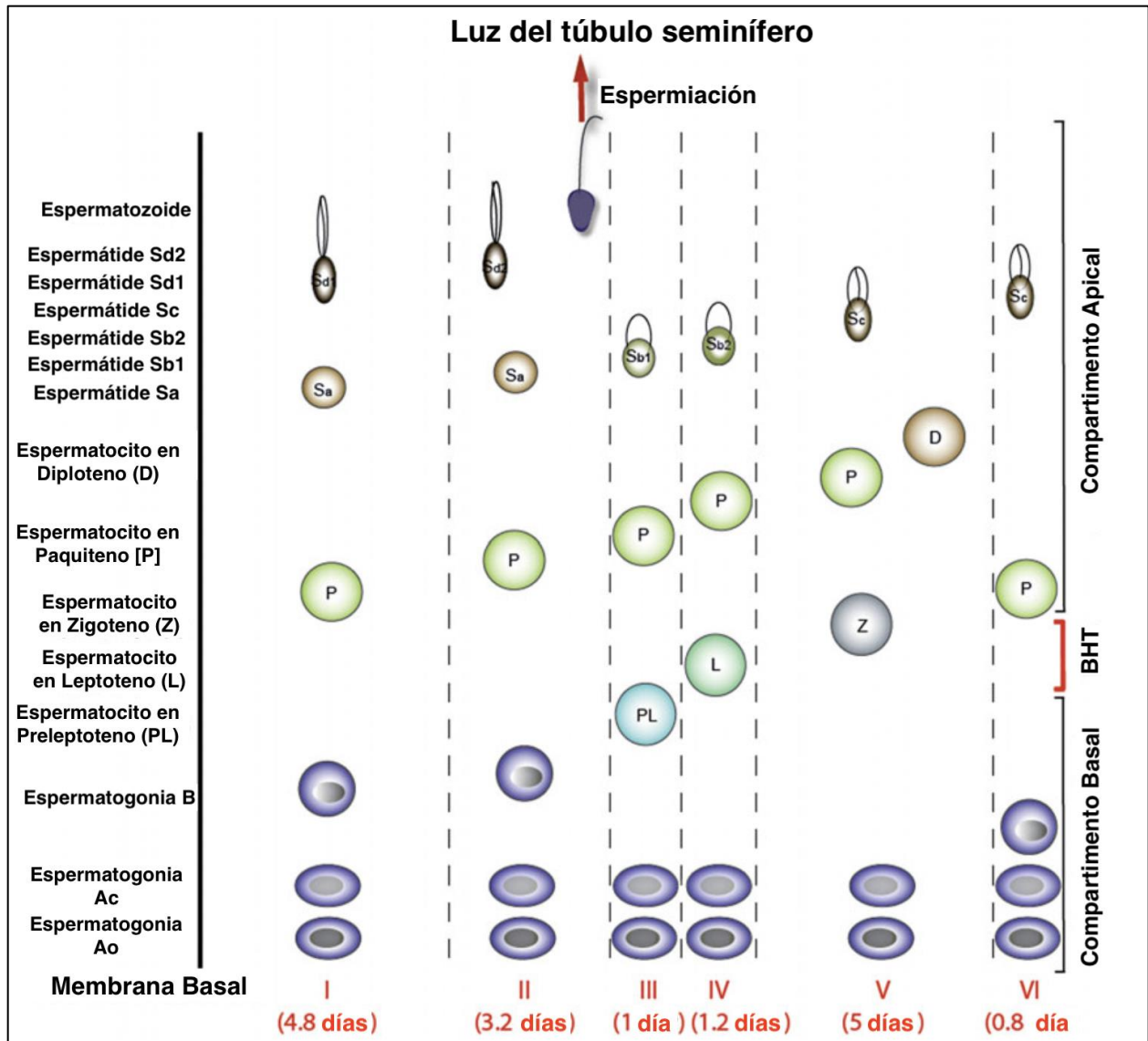
### 1.3 Regulación de la espermatogénesis por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo (HPT)

La espermatogénesis está regulada principalmente por hormonas de origen peptídica y esteroidea. Factores ambientales estimulan la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (por sus siglas en inglés GnRH) en el hipotálamo (Rolland, et al., 2008). La GnRH es un oligopéptido de diez aminoácidos que viaja por el sistema portal (capilares) de la eminencia media del tronco hipofisario hasta llegar a las células de los gonadotropos de la hipófisis anterior (adenohipófisis). La GnRH activa la transcripción de genes para las subunidades  $\beta$  de la familia de hormonas glucoproteínicas FSH, LH,

hormona coriónica gonadotrópica humana (hCG, human chorionic gonadotropin) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH, thyroid stimulating hormone) así como una subunidad  $\alpha$  común (Holt, et al., 2022). Estas hormonas heterodiméricas son liberadas hacia el torrente sanguíneo, donde se unen a sus receptores de membrana dentro del testículo. La FSH se une a su receptor en las células de Sertoli (Oliveira & Alves, 2015). En la célula de Sertoli se estimula la producción de la hormona inhibina B para la retroalimentación negativa y a la proteína que se une a andrógenos (ABP, androgen binding protein) para captar la testosterona. Además de otras proteínas y factores para mantener la espermatogénesis (Foster, 2017). La LH se une a su receptor en las células de Leydig donde se lleva a cabo la síntesis de la T. Por su parte la T, es liberada a los tejidos adyacentes y por su naturaleza lipídica, ingresa y se difunde a través de las membranas, en las células de Sertoli es capaz de unirse a los receptores de andrógenos (AR) presentes en el citosol (Zhou, et al., 2019) mientras que las células germinales carecen de estos receptores (Oliveira & Alves, 2015). La producción continua de testosterona por las células de Leydig se empieza a acumular dentro del túbulo seminífero, resultando en un incremento de la síntesis de Inhibina B por la célula de Sertoli, ocasionando una retroalimentación negativa a nivel de hipófisis, al inhibir la secreción de las hormonas gonadotropinas (Chen, et al., 2017; Foster, 2017; Goodman, 2009).

#### 1.4 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso regulado y cíclico (de Mateo & Sassone-Corsi, 2014; Chen, et al., 2017). En el hombre todo el proceso se lleva a cabo en aproximadamente 68 días dividido por etapas I-VI, se resume en la **Figura 1** (Chen, et al., 2017).



**Figura 1** Representación esquemática de las seis etapas en el ciclo epididimario (I-VI) en el testículo y las células germinales asociadas en el epitelio en cada una de las etapas. El proceso de espermiación se lleva a cabo en la etapa tardía II, los espermatocitos en preleptoteno entran a través de la barrera hematotesticular (BHT) en la etapa III. El proceso de espermatogénesis dura aproximadamente 68 días pasando por 4.2 ciclos (Cada ciclo dura 16 días) (Chen, et al., 2017).

Hay tres fases de la espermatogénesis: fase de proliferación de las espermatogonias, donde las células germinales inmaduras se someten a divisiones mitóticas, fase de crecimiento de los espermatocitos primarios donde hay una reducción del número de cromosomas por medio de divisiones meióticas (de Mateo & Sassone-Corsi, 2014; Hinson, et al., 2010), y por último, en la fase de maduración nuclear, donde se lleva a cabo la diferenciación para dar lugar a millones de espermatozoides maduros (Alberts, et al., 2002; de Mateo & Sassone-Corsi, 2014). Este proceso se lleva a cabo en los testículos dentro de los túbulos seminíferos donde se ubican las células de Sertoli;

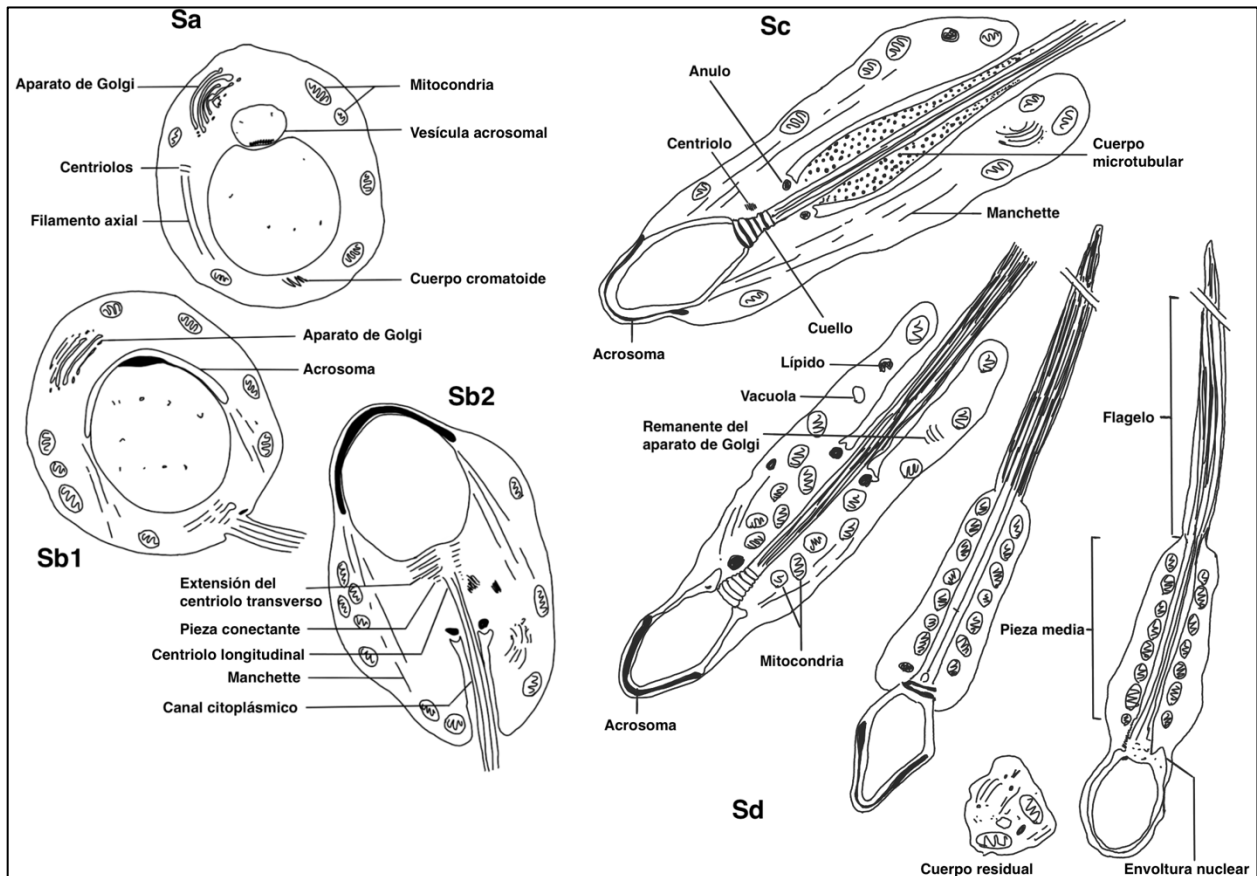
rodeando a los túbulos están las células de Leydig (de Rooij, 2017; Chen, et al., 2017). Las células de la estirpe germinal que se someten a divisiones mitóticas se les denomina espermatogonias, hay tres tipos de espermatogonias. Espermatogonia de tipo Ao (oscuras), Ac (claras) y B. Cada una desempeña un papel diferente en el túbulo. Se considera a las espermatogonias Ao, oscuras debido a que su núcleo se tiñe intensamente con la tinción hematoxilina-eosina (HE) y son células germinales que por medio de divisiones mitóticas dan origen a las espermatogonias Ac. Se denominan Ac, debido a que se tiñen claramente con la tinción HE (de Rooij, 2017; Chen, et al., 2017). La espermatogonia B es la única que sufre la última división mitótica (Alberts, et al., 2002) para dar origen al espermatozoides de primer orden (Shetty, 2018). Posteriormente estos espermatozoides primarios entran la primera división meiótica (Jones & Lopez, 2014). El primer estadio de la meiosis I, la profase I, es muy larga por lo que es posible distinguir a los espermatozoides primarios de otras células presentes en los túbulos seminíferos (Oehninger & Kruger, 2021). Cabe mencionar que durante la profase I ocurre la condensación de la cromatina y entrecruzamiento por medio de la formación de los quiasmas entre cromosomas homólogos (Alberts, et al., 2002) (Chen, et al., 2017). Terminado la primera división meiótica, los espermatozoides de primer orden entran a la segunda división meiótica convirtiéndose en espermatozoides secundarios. Las espermátides son el resultado de esta última división porque se ha reducido la información génica siendo ya células haploides (Chen, et al., 2017).

#### 1.4.1 Espermiogénesis

La espermátide, resultado de la segunda fase de meiosis, entra a la espermiogénesis en un proceso que se divide en cuatro fases distintivas (Khawar, et al., 2019) (Vertika, et al., 2020), se resume en la **Figura 2** de la siguiente manera:

- 1) Fase de Golgi: el aparato de Golgi empieza a secretar varias glucoproteínas, así como, vesículas que empiezan a constituir los gránulos proacrosomales que posteriormente darán origen al acrosoma maduro (Wang, et al., 2019). Las mitocondrias perinucleares empiezan a organizarse bajo la membrana nuclear (Vertika, et al., 2020). Los gránulos proacrosomales se empiezan a fusionar formando la vesícula acrosómica, la cual seguirá

creciendo debido a de la secreción de los gránulos; dando polaridad a la célula: un polo anterior y un polo posterior. En el polo posterior se ubican los centriolos: el centriolo proximal, opuesto a la vesícula, en forma horizontal y el centriolo distal en forma perpendicular, el cual es el encargado de emitir el flagelo (Avidor-Reiss, et al., 2020; Nigg & Raff, 2009).



**Figura 2** Diferenciación de una espermátide a un espermatozoide maduro durante la espermiogénesis. Las fases que se muestran en la imagen corresponden a Sa y Sb: fase de Golgi; Sb2: fase de casquete; Sc: fase acrosómica; Sd: fase de maduración. (Vertika, et al., 2020).

Característicamente, el flagelo nunca perfora la célula, la membrana plasmática lo protege.

2) Fase de casquete: la vesícula acrosómica se aplana y empieza a cubrir el núcleo. El centriolo distal sigue formando el flagelo, continuando éste a alargarse. Durante esta fase, el cuerpo cromatoide (relacionado con el centriolo distal) migra hacia el centriolo distal formando un anillo, conocido como el anillo de Jensen (se encargará de formar el flagelo) (Avidor-Reiss, et al., 2020; Sharma & Agarwal, 2011).

3) Fase acrosómica: la espermátide tardía experimenta un giro de  $180^\circ$  hacia la luz del túbulo, quedando así, el flagelo hacia la luz. Esta fase es muy importante dado que toda la información que se almacenó durante la profase I diploteno se usa para sintetizar una cantidad de proteínas que permitirán la compactación y reorganización de la cromatina nuclear (Chen, et al., 2017). El primer evento involucra reemplazar a las histonas somáticas por variantes de histonas testículo-específicas, proteínas de transición (PT) (que son incorporadas en el núcleo de las espermátides) seguido y por último por protaminas, reemplazando a las PT, ocasionando un empaquetamiento altamente condensado el genoma en el núcleo de la espermátide tardía (Hao, et al., 2019; Wang, et al., 2019). Morfológicamente el núcleo cambia y se observa ya un núcleo pequeño. El acrosoma en esta fase rodea 2/3 partes del núcleo. Se desplaza caudalmente el anillo de Jensen (anulo), desciende a través del flagelo. Dando origen a la pieza media. Las mitocondrias empiezan a ubicarse en la pieza media en forma de espiral rodeando al flagelo (Vertika, et al., 2020). Todo el citoplasma empieza a desplazarse caudalmente por lo que se puede observar una pequeña burbuja denominada cuerpo residual.

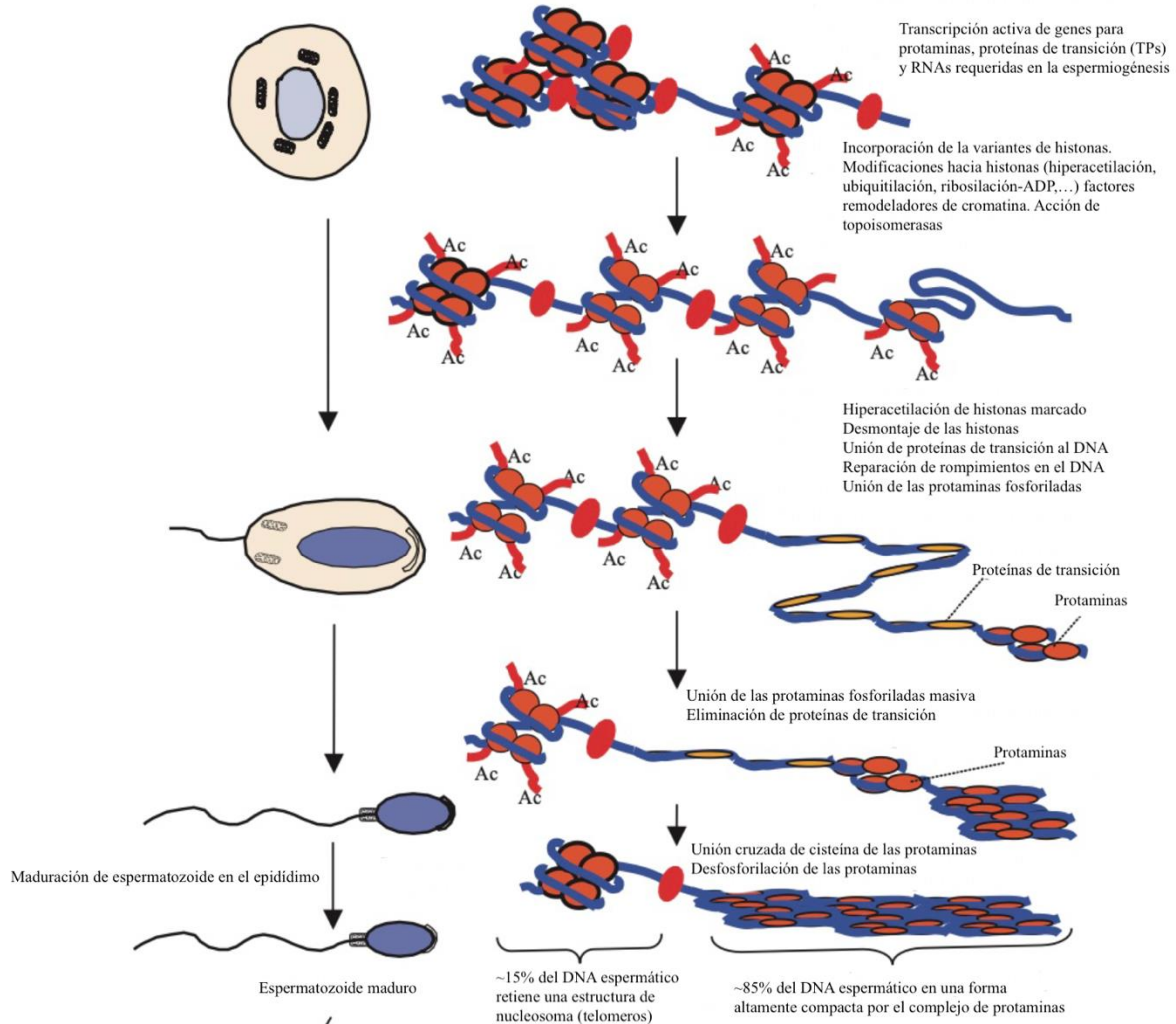
4) Fase de maduración: el cuerpo residual se desprende y es fagocitado por las células de Sertoli. Posteriormente el espermatozoide, por medio de un proceso que se denomina espermiación, se desprende de la célula de Sertoli y queda en la luz del túbulo seminífero (Li, et al., 2017). Los túbulos seminíferos, por medio de contracciones, conducen los espermatozoides hacia el epidídimo conectado por la *rete testis*, donde llevan a cabo su maduración (Eliasson, 2010).

#### 1.4.2 Intercambio de histonas por protaminas

Cuando el espermatozocito secundario termina la última división meiótica se convierte en una espermátide. El DNA espermático en la espermátide temprana está empaquetado en el núcleo por ocho histonas (2 de H2A, 2 de H2B, 2 de H3 y 2 de H4) (Carrell, et al., 2007) formando complejos denominados nucleosomas (Govin, et al., 2004), así como la histona H1 que se encarga de unir a los nucleosomas (Carrell, et al., 2007). La cromatina pasa por un proceso de compactación (Kim, 2018; Wang, et al., 2019), siendo un evento que empieza en el proceso de espermiogénesis (Jodar & Olivia, 2014), empezando en



la fase acrosómica, donde la topoisomerasa II cumple el papel de desenrollar las cadenas del DNA y por medio de la hiperacetilación de las histonas, así como otras modificaciones, se disocian los nucleosomas (Carrell, et al., 2007). Se incorporan variantes de histona testículo-específicas e histonas modificadas post-traduccionalmente (PTMs) (Carrell & Liu, 2001). Posteriormente, las proteínas de transición nuclear (Transition nuclear protein TNP) 1 y 2 (Akmal, et al., 2016; Brewer, et al., 2002) se unen al DNA temporalmente para después ser reemplazadas por protaminas (Jodar & Oliva, 2014; Torres-Flores & Hernández-Hernández, 2020). Las protaminas son oligopéptidos (4,000-12,000 Da) compuestos de >50% de arginina (Lewis, et al., 2004) y cisteína. Se pueden encontrar dos tipos de protaminas (P), P1 y la familia de P2 se conforma de P2, P3 y P4 (Oliva, 2006). Se reporta la presencia de la P1 en todos los mamíferos y se compone de 50 aminoácidos, mientras que P2 pasa por un proceso de condensación, al principio se conforma de 103 aminoácidos y se corta a 53 al unirse a una proteína precursora del DNA (no está presente en los esperamtozoides del toro ni del jabalí) (Carrell & Liu, 2001). El espermatozoide madura en el epidídimo, es aquí donde a través de enlaces disulfuro (cisteína) se estabilizan los complejos de protaminas que mantendrán al DNA compactado (Oliva, 2006; Yoshida, et al., 2018), los cambios significativos a la cromatina se resumen en la **Figura 3**. Se ha propuesto que las funciones principales de las protaminas son: 1) debido a que poseen una carga positiva, se unen fuertemente al DNA y así son capaces de neutralizar las cargas y 2) protegen el genoma paterno de la acción de las endonucleasas o por factores ambientales (Oliva, 2006; Steger, et al., 2010; Torres-Flores & Hernández-Hernández, 2020). En los humanos, solo aproximadamente el 15% de histonas (H2A, H2B y H3) permanecen asociados a la cromatina espermática (Bianchi, et al., 2021; Carrell & Liu, 2001; Carrell, et al., 2007; Dos Santos Hamilton & Ortiz D'Ávila Assumpção, 2019; Lakshamanan, et al., 2020; Oliva, 2006; Sharma & Kumar, 2017; Yoshida, et al., 2018; Zhang, et al., 2006)



**Figura 3** Representación esquemática de los cambios principales en la cromatina en la transición de histona a protamina. La hiperacetilación en el N-terminal de las histonas está representado por 'Ac'. Tomado y modificado de (Oliva, 2006).

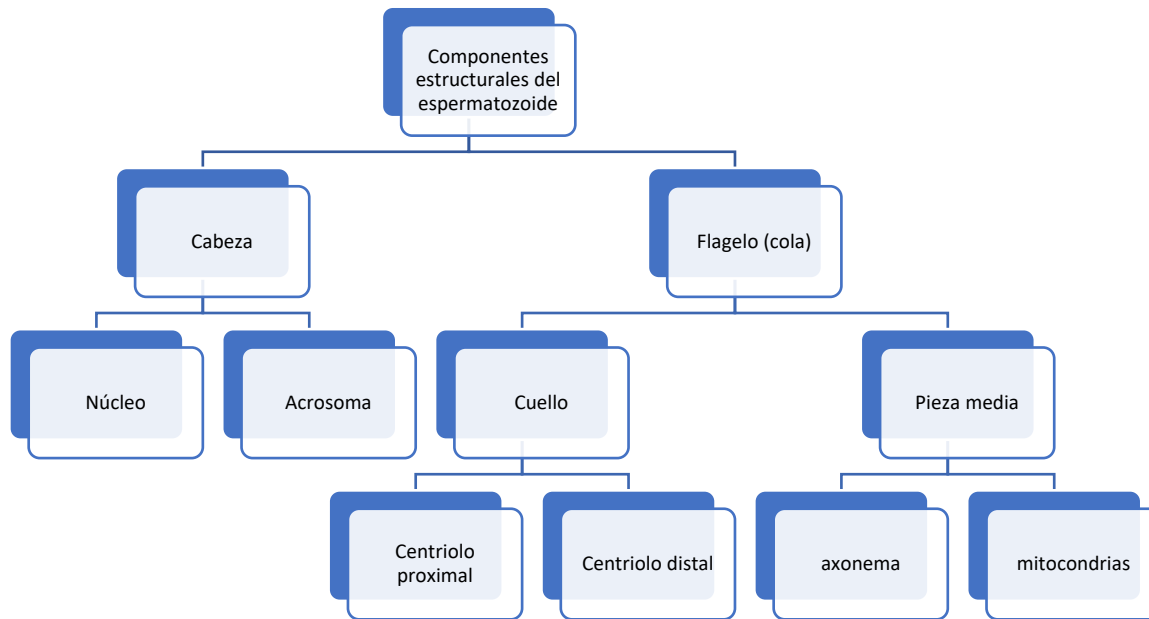
### 1.4.3 Maduración en el epidídimo

Es importante mencionar que los espermatozoides que se encuentran en el testículo son inmóviles e incapaces de fecundar al ovocito (Yoshida, et al., 2018). Por medio de contracciones en los túbulos seminíferos viajan por la *rete testis* a los conductos eferentes hasta llegar al epidídimo donde se lleva a cabo la secreción de varias enzimas y proteínas para la maduración de la membrana plasmática de tanto la cabeza hasta la cola del espermatozoide. El epidídimo está conformando por tres regiones: cabeza, cuerpo y cola que, en comparación con otros mamíferos, en el humano no se distinguen fácilmente (Sullivan, et al., 2019). Las criptas participan en la diferenciación y expresión

de genes a través de la longitud del epidídimo. Las regiones proximales que comprenden el segmento inicial y la cabeza se encargan principalmente de llevar a cabo la maduración de los espermatozoides mientras que la parte distal los mantiene en un estado de latencia, es decir, almacenados. Esta región en los humanos, posterior a dos o tres eyaculados, se vacía de espermatozoides (Sullivan, et al., 2019). La condensación del DNA se empieza en la espermiogénesis, sin embargo, este proceso continúa a lo largo del paso del espermatozoide por el epidídimo (Yoshida, et al., 2018). Al entrar los espermatozoides al epidídimo, estos son bañados por el líquido luminal ocasionado cambios en la concentración de proteínas, las cuales están asociadas con las primeras modificaciones que sufren los espermatozoides (Dacheux & Dacheux, 2014), como son, cambios moleculares: un incremento de los residuos de ácido siálico para la formación de enlaces disulfuro ya que el reemplazo de histonas por protaminas continúa en el epidídimo, disminución de colesterol y proporción de los lípidos cambiando la fluidez en la membrana plasmática, fosforilación de la proteína de superficie IZUMO1 (importante para el reconocimiento con el ovocito) y procesamiento de RNAs de transferencia (RNAt).

## 1.5 Espermatozoides

Los espermatozoides son células altamente especializadas que pasan por un proceso de diferenciación en el testículo (Bianchi, et al., 2021) para posteriormente madurar en el epidídimo, es aquí donde adquieren movilidad y su capacidad de fecundar al ovocito dentro del tracto femenino (James, et al., 2020). El espermatozoide maduro está conformado por una cabeza, pieza media y cola o flagelo (**Figura 4**) (Sharma & Kumar, 2017).



**Figura 4** Componentes estructurales del espermatozoide (Sharma & Kumar, 2017).

En la cabeza podemos encontrar el núcleo, el cual contiene el DNA paterno altamente compactado y el acrosoma, estructura que se encuentra llena de enzimas para facilitar la fusión con el óvulo. En el flagelo o cola del espermatozoide se ubican principalmente las mitocondrias las cuales proporcionan la energía necesaria para su desplazamiento (Sharma & Kumar, 2017).

## 2. Infertilidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad como la incapacidad de una pareja de concebir un bebé a lo largo de un año de haber tenido relaciones sexuales habituales, sin el uso de anticonceptivos (Sedes, et al., 2018; Brovko, et al., 2009). A nivel mundial el 15% de parejas son diagnosticados infértiles (Spiropoulos, et al., 2002), de estos 40% son debidos al factor masculino, 40% por factor femenino y 20% factores por factores idiopáticos. Algunas causas de la infertilidad pueden ser clasificados en astenozoospermia (baja motilidad) siendo éste el diagnóstico más común (Sedes, et al., 2018) así como en el bajo número de espermatozoides (oligozoospermia) (Spiropoulos, et al., 2002). Aproximadamente entre el 10-20% de las parejas con infertilidad no

presentan alteraciones clínicas aparentes, por lo cual se recurre a enfoques de diagnóstico convencionales (Esteves, 2019) detallados en el manual de procesamiento y análisis de semen humano de la OMS que se actualiza cada diez años. En México se establece que el 17% de la población en la edad reproductiva presenta algún trastorno relacionado con la infertilidad, de estos, 31% corresponde al factor masculino y el 32% corresponde a factor femenino de acuerdo con las cifras del Consejo Nacional de Población (CONAPO) (Barroso Villa, 2019). Las causas de la infertilidad se pueden dividir en dos categorías: 1) causas intrínsecas 2) causas extrínsecas; provocando anomalías a nivel del espermatozoide durante el proceso de su diferenciación o su pasaje por el tracto sexual masculino. Las etiologías que involucran lesiones en los testículos están relacionadas con factores genéticos y factores ambientales (Sedes, et al., 2018). La fertilidad masculina depende en gran medida del éxito de la espermatogénesis (Chen, et al., 2017), un proceso que involucra varios pasos en la multiplicación y desarrollo de las células germinales masculinas resultando en una producción diaria de millones de espermatozoides. En el hombre se producen aproximadamente 40 millones de espermatozoides por día desde el comienzo de la pubertad y durante toda la vida reproductiva (Sedes, et al., 2018). Los problemas de fertilidad parecen estar aumentando en frecuencia. Una gran proporción de casos de infertilidad se debe al factor masculino, que al analizar el eyaculado se identifica como astenozoospermia (baja motilidad), oligozoospermia (baja concentración), teratozoospermia (morfología anormal) o necrozoospermia (espermatozoides muertos). Tales trastornos son causados generalmente por defectos que ocurren en la formación o maduración del espermatozoide (Luo, et al., 2016).

## 2.1 Causas intrínsecas de la infertilidad

Como se ha mencionado en secciones anteriores la calidad seminal depende de las secreciones en los testículos, epidídimo, las vesículas seminales y la próstata. El contenido del líquido seminal está compuesto por iones inorgánicos por ejemplo  $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$ , ácidos orgánicos, azúcares, lípidos, moléculas esteroideas, aminoácidos, poliaminas, base nitrogenadas y proteínas (Mesiano & Jones, 2017). Debido a estos

componentes, un desbalance en la producción de estas moléculas puede ocasionar alteraciones en los procesos (Poiani, 2006). Alteraciones causadas por patologías o inmunológicas provocan cambios en las glándulas y así la composición del líquido seminal (Mesiano & Jones, 2017), ocasionando problemas de fertilidad.

### 2.1.1 Hipogonadismo

El hipogonadismo masculino se caracteriza por presentar una disminución de la función testicular, es decir, se presenta una baja producción de testosterona ocasionando infertilidad. El hipogonadismo puede deberse a un problema intrínseco de los testículos, debido a una alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo o una alteración en la conversión de andrógenos para la conversión a testosterona (resistencia androgénica) (Smith & Walker, 2014). Algunos síntomas que se pueden manifestar son la caída del vello corporal y cambios en la voz y según la edad del paciente, así como, presentarse una atrofia testicular. El diagnóstico clínico se define con la presencia de concentraciones bajas de testosterona en el plasma. Si existe una alta concentración de las hormonas gonadotrópicas circulantes (FSH y LH) se trata de un hipergonadotrópico. Si el nivel de éstas es por debajo del normal, se determina hipogonadotrópico. Para el tratamiento de los pacientes con hipogonadismo, se administra principalmente testosterona (Chen, et al., 2017; Smith & Walker, 2014) Altos niveles de prolactina pueden provocar un hipogonadismo hipogonadotrópico observándose bajos niveles de hormonas sexuales impactando la calidad de los espermatozoides producto de la espermatogénesis. La prolactina inhibe la secreción del GnRH y por ende la síntesis de hormonas sexuales (Gao, et al., 2019; Zhou, et al., 2019). Ciertas patologías como son la falla renal, el hipotiroidismo y la cirrosis pueden elevar los niveles de prolactina en sangre al igual que algunos medicamentos que bloquean los efectos de dopamina. Se ha reportado que altos niveles de progesterona y estrógenos exógenos interfieren en la retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Agarwal, et al., 2012).

### 2.1.2 Varicocele

El varicocele es otra causa intrínseca de infertilidad. Se presenta cuando hay una dilatación de las venas a lo largo del cordón espermático provocando una circulación sanguínea inapropiada. Este padecimiento, la mayoría de las veces, no presenta síntomas ocasionando alteraciones en los parámetros al momento de evaluar la calidad del semen, como son, concentración, movilidad entre otros aspectos morfológicos. Altas temperaturas incrementan el metabolismo en el testículo y epidídimo (Cantabria, 2017; Ntemou, et al., 2019) y por consecuencia, incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) ya que disminuye el poder antioxidante, fenómeno que puede alterar el DNA del espermatozoide. Factores externos contribuyentes a esto incluyen estrés, quimioterapia y golpes agudos (Steger, et al., 2010; Roque & Esteves, 2018), altas temperaturas pueden influir en la interrupción del mecanismo de intercambio de calor en los testículos, causando hipertermia. Numerosos estudios demuestran que a temperaturas altas se altera la producción y maduración espermática, así como una disminución en la calidad del semen (Cho, et al., 2016).

### 2.1.3 Daño al DNA (fragmentación)

En la mayoría de los casos de pacientes con infertilidad idiopática se observan daños en el DNA, se denomina fragmentación del DNA. Debido a la estructura de doble hélice del DNA, la fragmentación puede presentarse en una hebra sencilla o de doble cadena. Para contrarrestar este daño la célula posee mecanismos de reparación los cuales se manifiestan en ciertos puntos de la espermatogénesis, sin embargo, son silenciados cuando se empieza la compactación de la cromatina en la espermiogénesis, así como, en la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (Takeshima, et al., 2020). Durante el evento de empaquetamiento y condensación, la cromatina experimenta cambios conformacionales al ser cambiado proteínas de transición (TP) y posteriormente por protaminas. Durante este proceso, participan varias enzimas y factores de transcripción que relajan, desorganizan y reordenan la cromatina (Oliva, 2006). La cromatina se organiza en bucles resultando en la mitad del tamaño de la cromatina en una célula somática, se enrolla de 6 a 20 veces en la protamina (Carrell, et al., 2007;

Champroux, et al., 2018). Específicamente se une P1 y P2 en los surcos menores y mayores del DNA interaccionando electrostáticamente con los residuos de fosfato (Carrell, et al., 2007). En los humanos, la proporción de protaminas es de 1:1 (Agarwal, et al., 2016; Akmal, et al., 2016; Benchaib, et al., 2007; Bianchi, et al., 2021; Brewer, et al., 2002; Carrell, et al., 2007; Dos Santos Hamilton & Ortiz D'Ávila Assumpção, 2019; Oliva, 2006). A diferencia de otros mamíferos, el porcentaje de histonas que permanece en el núcleo es más elevado siendo éste del 15% (Bianchi, et al., 2021; Kim, 2018; Ioannou, Miller, Griffin, & Tempest, 2016), alteraciones en esta transición pueden provocar azoospermia, oligospermia o teratozoospermia, lo que conduce a la infertilidad masculina (Wang, Gao, Li, & Liu, 2019). La disrupción de este proceso o alteración en esta proporción, apoptosis o un exceso de ERO incrementan la susceptibilidad a la fragmentación al DNA (Dos Santos Hamilton & Ortiz D'Ávila Assumpção, 2019). Cuando ocurre una protaminación inadecuada la condensación de la cromatina se puede ver afectada en durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo (Yoshida, et al., 2018).

## 2.2 Causas extrínsecas de la infertilidad

Muchos estudios proporcionaron evidencia de que los contaminantes del aire tienen un impacto negativo en la salud humana ya que los contaminantes presentes en el aire (partículas sólidas, gotas líquidas o gases) pueden ser artificiales o naturales. Actividades como el transporte, las emisiones industriales y agrícolas, se consideran las principales causas de la contaminación del aire (Brunekreef & Holgate, 2002; Unger, et al., 2010). Se ha demostrado que la contaminación del aire afecta la longitud de los telómeros de los espermatozoides, afectando el desarrollo embrionario temprano (factor masculino) (Dioni, et al., 2011; Vecoli, et al., 2017; Yang, et al., 2015). La mala calidad aire puede que no afecte los parámetros morfológicos del líquido seminal, aunque puede generar niveles más altos de fragmentación del DNA espermático; incluso los hombres con parámetros normales en la calidad del semen pueden tener un alto grado de



fragmentación del DNA, lo que posiblemente explique la infertilidad masculina idiopática (Bosco, et al., 2018).

### 3. Calidad Seminal

#### 3.1 Efecto del pH sobre la calidad seminal

Según la región donde se encuentren los espermatozoides alteraciones al pH son importantes ya que se ve afectada la tasa metabólica y consecuentemente la movilidad de los espermatozoides (Zhou, et al., 2015). En los túbulos seminíferos y la *rete testis* los espermatozoides se encuentran en un pH normal de 7.2 a 7.4, 6.5 en el epidídimo, 6.7 en la cabeza y de 6.8 en la cola. Durante la eyaculación es de 7.4 a 8.4, posteriormente en el tracto reproductor femenino, en la vagina es de 4.5 a 7.5, subiendo al cérvix se incrementa paulatinamente hasta llegar a las trompas de Falopio con un pH máximo de 7.8 (Mishra, et al., 2018). Debido a estos cambios en el pH se regula la apertura de los canales específicos de calcio ( $Ca^{2+}$ ). El flujo del  $Ca^{2+}$  a través de los canales CatSper está involucrado con los procesos de hiperactivación, capacitación y la reacción acrosómica (Ren, et al., 2001).

#### 3.2 Efecto de la viscosidad sobre la calidad seminal

Otro parámetro importante de analizar es la viscosidad, si el líquido seminal se encuentra en los rangos normales, la migración de los espermatozoides hacia las trompas de Falopio es óptimo, se ha observado que se mantiene la movilidad espermática, la integridad de la cromatina, y se previene la lipoperoxidación y así como, mantener la integridad de la cromatina. En los pacientes con una patología de fertilidad, se observa un incremento en la viscosidad, que se asocia con astenozoospermia debido a que los espermatozoides se quedan agrupados por la alta viscosidad (Barbagallo, et al., 2021).

### 3.3 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

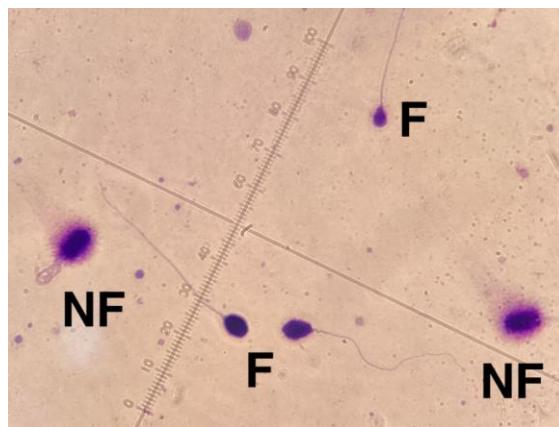
Los radicales libres son moléculas inestables de intermediarios que contienen uno o más electrones desapareados (Sanocka & Kurpisz, 2004) conocidos también como especies reactivas capaces de aceptar o ceder electrones de otras moléculas provocando así un estrés oxidante (Takeshima, et al., 2020). El estrés oxidante es un factor importante para cumplir ciertas funciones involucradas en la maduración espermática, estas siendo hiperactivación, capacitación, reacción acrosómica y la fecundación. Sin embargo, altos niveles de ERO provocan daños al DNA ya sea de forma directa o indirectamente a través de la activación de caspasas o endonucleasas. Se reportan altos niveles de ERO en pacientes infértiles, provocando así un incremento en la peroxidación lipídica de la membrana celular, así como, fragmentación del DNA, tanto nuclear como mitocondrial, esto puede provocar apoptosis. Se reporta que la fragmentación en el DNA debido a ERO ocurre después de la espermiación, cuando los espermatozoides salen de los túbulos seminíferos y pasan por los diferentes conductos del aparato reproductor debido a cambios en las secreciones de las glándulas, particularmente la próstata, la cual secreta factores antioxidantes, así como azúcares y sulfatos para prevenir la agregación de las cabezas de los espermatozoides. Otra fuente de ERO en el líquido seminal es la presencia de leucocitos y espermatozoides con alteraciones en la cabeza o con residuo citoplasmático. Los principales daños que provocan las ERO al DNA se dan a la formación de 8-OH-guanina y 8-OH-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), que son guaninas oxidadas. Un incremento de concentración de 8-OHdG atribuye a el rompimiento en la cadena del DNA (Takeshima, et al., 2020) y debido a ello se puede analizar el nivel de fragmentación por ERO.

## 4. Técnicas de evaluación de daño al DNA

Las pruebas evaluación de daño al DNA en los espermatozoides (SDF por sus siglas en inglés, Sperm DNA fragmentation), permiten conocer la integridad del DNA y el contenido genético que se transmitirá a las generaciones posteriores (Agarwal, et al., 2012). Para

ello existen dos tipos ensayos para medir el SDF, 1) miden directamente al usar sondas o colorantes y 2) (indirecto) midiendo la susceptibilidad del DNA a la desnaturalización (Agarwal, et al., 2016). Los métodos directos incluyen la técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) (Twigg, et al., 1998) y el ensayo Cometa con pH neutro; y los indirectos comprenden: prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD) (Fernández, et al., 2005), el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA), ensayo de naranja de acridina (AO) y ensayo Cometa con pH alcalino (Portella-Ruiz & Gonzales, 2016). Para fines clínicos, la prueba más económica y rápida de realizar es la SCD ya que no hay diferencias significativas al método usado para la determinación de SDF (Chohan, et al., 2006).

La prueba de SCD da un resultado cualitativo. El kit de Halosperm®, contiene unas soluciones que permiten ver la integridad del DNA en el espermatozoide al usar una serie de soluciones para la lisis de la membrana espermática exponiendo los bucles de las cadenas del DNA. Expresados morfológicamente con una presencia o ausencia de un halo. La presencia de un halo rodeando la cabeza del espermatozoide indica una cromatina íntegra por lo que se clasifica como un espermatozoide no fragmentado como se demuestra en la **Figura 5**. De lo contrario, la ausencia de halo, el DNA se encuentra fragmentado al ser susceptible a degradación por las soluciones ácidas y de lisis.



**Figura 5** Evaluación de la fragmentación del DNA. F: espermatozoide fragmentado. NF: espermatozoide sin fragmentación. Tinción Diff-Quick. 100X.

## 5. Antecedentes

El análisis seminal es un procedimiento importante para conocer aspectos morfológicos de la calidad del eyaculado en pacientes que acuden a una clínica de reproducción asistida (Agarwal, et al., 2016). Consiste en analizar ciertos aspectos morfológicos macroscópicos: licuefacción, pH, color; y microscópicos: concentración y movilidad (Simon, et al., 2017) (World Health Organization, 2021). Se ha reportado (Eliasson, 2010) que hay anomalías en hombres infértiles, sin embargo, se han demostrado que otros factores pueden afectar la infertilidad aun cuando los resultados del análisis seminal muestre valores normales (Simon, et al., 2017). Debido a ello se procede al análisis de la integridad del DNA (Agarwal, et al., 2016). Conocer la integridad del DNA espermático se ha vuelto un requisito para conocer el resultado de la fertilización normal y la transmisión de la información genética paterna (Benchab, et al., 2007; Collins, et al., 2008). Un estudio realizado por Suganuma et al. (2005) al usar ratones knockout (KO) para TP, recuperados de la cola del epidídimo y de los testículos realizaron inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) con óvulos enucleados y normales. Demostraron que, al inyectar a los óvulos enucleados con espermatozoides móviles recuperados de la cola del epidídimo con el gen KO TP, no se lleva a cabo el desarrollo embrionario adecuado. De este trabajo se concluyen varios aspectos de la reproducción asistida, 1) el espermatozoide puede estar morfológicamente normal, es decir, presentar un análisis seminal con parámetros normales y ser incapaz de fertilizar el ovocito y 2) el óvulo no presenta los elementos necesarios para reparar los daños en la cromatina del espermatozoide. La ausencia de TP presenta alteraciones y daños en la cromatina espermática ocasionando una baja fertilidad e incapacidad de implantación del embrión en el útero.

Yoshida et al., (2018) realizaron estudios en ratones y demuestran que la protaminación no se termina en la espermiogénesis, sino que continúa hasta salir del epidídimo. Usando el ensayo de dispersión de la cromatina, para teñir la presencia de histonas presentes en el DNA, observaron que mientras los espermatozoides siguen el paso por el epidídimo, el porcentaje de histona presentes va disminuyendo (Yoshida, et al., 2018). En el caso

de los ratones, aproximadamente el 8% de histonas permanecen presentes en la cromatina, mientras que en humanos se reportan que este valor es del 15% (Carrell & Liu, 2001; Carreau, et al., 2010; Torres-Flores & Hernández-Hernández, 2020). Debido a estos estudios el DNA en el espermatozoide es susceptible a daños aun saliendo del testículo. Carrell y Liu (2001), analizan la importancia de las protaminas, particularmente la P2 en el proceso de la fertilización *in vitro* (FIV). De los 75 pacientes infértiles en procedimiento de FIV, 13 no presentaron bandas de P2. En conclusión, este estudio ha demostrado que los niveles anormales de protaminas en los espermatozoides son un evento relativamente común en pacientes infértiles. La proporción P1:P2 generalmente aumenta en pacientes infértiles en comparación con el grupo control de  $1.12 \pm 0.04$  y  $0.83 \pm 0.05$  respectivamente, así como, la disminución de la capacidad de penetración de los espermatozoides se asocia con una expresión alterada de P2 (Carrell & Liu, 2001). Saleh, et al., (2002) tomaron una muestra de 92 pacientes infértiles (16 fueron donantes), de los cuales el 23% de ellos presentaron parámetros dentro de los rangos normales (concentración, movilidad y morfología), el 77% presentaba anormalidades en uno o más de estos parámetros. Al determinar el índice de fragmentación de DNA (DFI, DNA Fragmentation Index) determinaron que el porcentaje de DFI fue mayor en pacientes infértiles con parámetros morfológicos normales que los donantes, sin embargo, este parámetro fue similar al de los pacientes con anormalidades (Saleh, et al., 2002). Se ha encontrado una mayor incidencia de daños al DNA en pacientes infértiles comparado con pacientes sin ninguna complicación (Saleh, et al., 2002), los cuales se pueden medir mediante pruebas que permite conocer la integridad del DNA (Evenson, 2017). La prueba de SDF, mide la calidad del espermatozoide y la calidad nuclear del paquete de DNA y, por lo tanto, es más significativo que los parámetros analizados en análisis de semen simplemente morfológicos (Kim, 2018).

Un estudio realizado por Jeremias, et al., (2021), incluyó 94 adultos normozoospermicos, de los cuales 39 fueron hombres sin varicocele (el grupo control) y 55 hombres con varicocele de diferente grado, donde encontraron que el grupo de varicocele presentó una mayor tasa de espermatozoides con DNA fragmentado. Por otro lado, Dhwan y colaboradores (2018) obtuvieron muestras de semen de 60 hombres quienes junto con

sus parejas presentaban abortos frecuentes, así como 30 muestras de donadores. Analizando parámetros morfológicos según la OMS (2010), el DFI, expresión de genes, y ERO. Determinaron que los pacientes con abortos frecuentes presentaron anomalías en la transcripción de genes durante la espermiogénesis tardía por lo que afecta al proceso de embriogénesis. Reportan un DFI >30.7% en los pacientes con abortos frecuentes, así como, un incremento en ERO con aproximadamente 32.0 unidades de luz reactiva (RLU; por sus siglas en inglés: reactive light units)  $s^{-1}$  million<sup>-1</sup>.

Liffner y colaboradores (2019) utilizaron el manual de análisis seminal de la OMS (2010) para analizar el semen eyaculado en fresco donde midieron concentración, movilidad y morfología y argumentan que es importante estandarizar parámetros para el laboratorio donde se hagan los procedimientos debido a que hay pacientes con resultados en los rangos aceptables que son diagnosticados infértiles. Por lo tanto, si el espermatozoide está en rango normales en cuanto a aspectos morfológicos, los autores procedieron a estudiar el espermatozoide de estos pacientes a nivel nuclear. Analizaron 42 muestras seminales de estos, 14 fueron de donantes sanos. Implementaron usar técnicas como: dispersión de la cromatina espermática (SCD) y ensayo de la estructura de la cromatina del espermatozoide. Concluyeron que, independientemente de la técnica utilizada, los pacientes infértiles mostraron tasas de fragmentación del DNA significativamente más altas en comparación con los donantes fértiles, muy por encima de los valores considerados umbrales clínicamente normales (Liffner, et al., 2019). En una revisión realizada por Evgeni y colaboradores (2014) se describe que después de que el embrión pasa de 4 a 8 células el genoma paterno se enciende (transcripcionalmente) así que, si hay anomalías en la integridad del DNA, difícilmente llega a la etapa de blastocisto; sin embargo, no indican el límite de este daño al DNA, pero se evidencia en las técnicas de reproducción utilizadas, siendo estas FIV e ICSI (Evgeni, et al., 2014).

## 6. Justificación

Los factores que afectan la infertilidad en una pareja son variables ya que tienen diferente origen. Se estima que la infertilidad en México es del 17% y de éste la tercera parte corresponde al factor masculino. Una de las posibles causas de la infertilidad idiopática es una baja calidad seminal y una fragmentación del DNA aumentada de los espermatozoides por lo que es importante llevar a cabo estudios que permitan conocer la morfología del espermatozoide, así como la integridad del DNA y su contribución en el desarrollo embrionario hasta el día dos en pacientes infértiles.

## 7. Pregunta de Investigación

¿Cuál es el efecto de la pérdida de la integridad del DNA del espermatozoide sobre la fecundación y el desarrollo embrionario, al día dos, en pacientes con baja calidad espermática?

## 7. Hipótesis

Los espermatozoides que presentan bajos índices de fragmentación del DNA son más capaces de fertilizar a los ovocitos y generar desarrollo embrionario al día 2

## 8. Objetivos

### 8.1 Objetivo General

Evaluar la calidad seminal y la fragmentación del DNA espermático en muestras de pacientes infértiles y su impacto en la fecundación y desarrollo embrionario

## 8.2 Objetivos Particulares

- Analizar la calidad seminal morfológica de muestras de pacientes infértiles
- Determinar el índice de fragmentación espermática del DNA en las muestras de pacientes infértiles
- Evaluar el efecto de los espermatozoides con bajos niveles de fragmentación del DNA sobre la fecundación y el desarrollo embrionario hasta el día dos

## 9. Método

### 9.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo en la clínica de reproducción asistida en la HISPAREP, Hospital Español, en la Ciudad de México. Una vez que el comité de ética del Hospital aprobó el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes individuales incluidos en este estudio. El estudio se realizó de 19 de enero 2021 al 19 de agosto del 2022. Se obtuvieron datos de todos los pacientes posibles que acudaron al HISPAREP para realizar una técnica de reproducción asistida. El día de la Aspiración folicular se realizaron los siguientes procedimientos: 1) análisis seminal (OMS 2021), 2) técnica de dispersión de la cromatina espermática (fragmentación de DNA en reproducción humana asistida) de la muestra en fresco, 3) técnicas de selección espermática (lavado, gradientes de densidad y swim-up) seleccionando a los mejores espermatozoides, 4) técnica de dispersión de la cromatina espermática en la muestra seleccionada para el ICSI.



Los datos obtenidos fueron acomodados por rangos de edad, calidad seminal, índice de fragmentación espermática (DFI) en fresco y post-capacitación, tasa de fecundación y calidad de desarrollo embrionario en día 2 (se determinó por el número de blastómeros y ubicación de fragmentos de 4 y 4 respectivamente) de pacientes, así como los del grupo control.

## 9.2 Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron en el estudio pacientes varones con un historial de no poder lograr un embarazo por factor masculino (idiopático) por inseminación o coito programado y que son sometidos a ciclos de ICSI dado a que la calidad seminal está afectada.

Criterios de no inclusión del estudio son todas aquellas parejas en donde la calidad seminal del varón presenta una patología conocida y los que no acepten firmar el consentimiento informado.

## 9.3 Comité de bioética y consentimiento informado

El estudio es 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” con el Dictamen del Comité Hospitalario de Bioética COMBIOETICA 09CHB10620171023, código asignado por el comité HISPCHB21-01. El cual se lleva a cabo en las instalaciones de la clínica HISPAREP, laboratorios de Andrología y fertilización *in vitro*.

Así mismo se tiene el “Consentimiento Informado para análisis de muestras de semen en fresco para procedimientos de reproducción asistida y protocolo de investigación” (Se anexan copia de los documentos)

#### 9.4 Análisis de Semen (OMS 2021)

Todas las muestras que llegan al laboratorio fueron obtenidas del paciente por masturbación con una abstinencia sexual de 3 a 5 días. Una vez obtenida la muestra se colocó de 30 minutos a 1 hora para que se licue. Posteriormente se determinaron los parámetros macroscópicos y microscópicos.

Para la concentración y movilidad se utilizó una cámara de recuento espermático (Mackler). Se contaron 200 espermatozoides utilizando la cámara de recuento dentro de un patrón de cuadrícula para una evaluación precisa. Se calculó la concentración por mililitro. La movilidad se determinó con base a la movilidad (progresiva, no progresiva e inmóvil). Para la morfología, se preparó un frotis de semen fijo (en portaobjetos), teñidos con Diff-Quik: pasando por una solución fijadora por 5 segundos luego de solución I (eosinofílica) por 10 minutos y después por la solución II (basofílica) por 10 minutos y posteriormente por 10 segundos de lavado con agua destilada y secado al aire. Los espermatozoides normales se componen típicamente de una cabeza ovalada lisa con una región acrosómica la cual cubre entre el 40% y el 70% de la cabeza del espermatozoide. Las dimensiones morfológicas normales se han definido como una cabeza de esperma de 3-5  $\mu\text{m}$  de longitud y 2-3  $\mu\text{m}$  de ancho. Además, el esperma debe estar desprovisto de defectos en la cabeza, la pieza media o la cola. Se analizó una aglutinación de los espermatozoides en la cual se caracterizan a los espermatozoides que se adhieren entre sí sin otras células o desechos. Los agregados generalmente sólo consisten en espermatozoides muertos.

#### 9.5 Técnica de Dispersión de la Cromatina (SCD) espermática (muestra en fresco)

A una fracción de la muestra (200  $\mu\text{l}$ ) que se realizó el análisis seminal, a la cual se le agregó 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo WASH (HTF [fluido tubárico humano] + HSA [albúmina humana 5%] ambos de In vitro Care). Se tomó una alícuota de 30  $\mu\text{L}$  colocándola en un

tubo cónico tipo Eppendorf con agarosa de bajo punto de fusión (para lograr esto se colocan los tubos Eppendorf a baño maría a 90-100°C por 5 min hasta que la agarosa quede líquida), para después ser colocada en baño maría a 37° C por 5 min. Después se pasan los 15 µL de semen al líquido de agarosa homogenizando rápidamente pasando los 15 µL con una micropipeta a un portaobjetos previamente tratado (Kit Halosperm®) y se cubre con un cubreobjetos de 18 x 18 mm (duplicado). Este portaobjetos se colocó horizontalmente en una placa fría de 4°C y dejándolo por 8 min, trascurrido ese tiempo se pasó a temperatura ambiente por 15 min hasta que estuvo perfectamente seco. Se sumergió horizontalmente en una solución desnaturalizante a temperatura ambiente por 7 min. Después se sumergió horizontalmente a una solución de lisis por 25 min y posteriormente por 5 min en un contenedor con agua destilada y después se pasó por alcoholes de concentración creciente (70%, 90% y 100%) por 2 min cada uno. Se secó al aire y se tiñó con Diff-Quik a temperatura ambiente. Las muestras se leyeron por microscopio de contraste de fases a inmersión.

Se contaron 500 espermatozoides por duplicado y se procedió a calcular el DIF con la siguiente fórmula:

$$DIF (\%) = 100 \times \frac{\text{Número de espermatozoides con fragmentación en el DNA}}{\text{Número total de espermatozoides}}$$

## 9.6 Técnicas de selección espermática.

### 9.6.1 Lavado

Esta es una técnica que concentra y separa los espermatozoides del líquido seminal. Una vez realizado el análisis de semen (OMS 2021) se procedió de la siguiente manera: Preparación 1) se recolectó el semen (seguido de un período (paciente) de abstinencia de 2 a 3 días) 2) la muestra se dejó licuificar a 37° C por 30 min 3) a la muestra licuada se le agregó 2 ml de medio HTF con HSA al 5%, esto es para romper viscosidad y dejar el pH del medio muy similar al medio donde están los ovocitos, 4) con la pipeta volumétrica de 2 ml se homogeneizó la mezcla del semen y el medio HSA (la muestra se

observa licuada cuando se deja caer el medio y éste cae gota a gota usando una pipeta de 2 ml).

### 9.6.2 Gradientes de Densidad

Sólo los mejores espermatozoides son capaces de atravesar los gradientes de densidad y llegar hasta el fondo. Para esto se requiere de una muestra de semen colocándola en un tubo cónico tipo Falcon de 15 ml y medio de lavado, para formar un gradiente de densidad de 90%, 75% y 45%. Quedando la concentración de 45% como la capa más superficial.

### 9.6.3 Swim-up

Esta técnica demuestra la capacidad de los espermatozoides con movilidad progresiva de avanzar en un medio de cultivo adecuado. Para ello, la muestra de semen se colocó en un tubo tipo Falcon de 15 ml junto con medio de lavado y medio de cultivo. 1) se obtuvo la muestra (como se describe anteriormente) 2) se centrifugó a 300 g por 10 min 3) se decantó 4) se depositó medio fresco 5) la muestra se incubó a 37°C por 45 min en un ángulo 45° 6) se retiró el sobrenadante. Para el procedimiento de fertilización *in vitro* (ICSI) se utilizaron las tres técnicas de selección espermática para seleccionar los mejores espermatozoides.

## 9.7 Técnica de Dispersión de la Cromatina espermática (SCD) (muestra recuperada)

De la muestra recuperada del Swim-up y que se utilizó para realizar el ICSI, se tomó una alícuota de 30  $\mu$ L y se colocó en un tubo tipo Eppendorf con agarosa de bajo punto de fusión (para lograr esto se colocaron los tubos tipo Eppendorf a baño maría de temperatura entre 90-100°C durante 5 min hasta que la agarosa quede líquida), y después se colocó en baño maría a 37° C por 5 min. Después se pasó 15  $\mu$ L de semen al líquido de agarosa homogenizando rápidamente pasando los 15  $\mu$ L con una

micropipeta a un portaobjetos previamente tratado (Kit Halosperm®) y se cubrió con un cubreobjetos de 18 x 18 mm (duplicado). Este portaobjetos se colocó horizontalmente en una placa fría que se encuentra a 4°C y se dejó por 8 min, una vez transcurrido ese tiempo se dejó a temperatura ambiente por 15 min para que esté perfectamente seca. Se sumergió horizontalmente en una solución desnaturalizante a temperatura ambiente por 7 min. Después se sumergió horizontalmente en una solución de lisis por 25 min y posteriormente, por 5 min en un contenedor con agua destilada y se pasó por alcoholes de concentración creciente (70%, 90% y 100%) por 2 min cada uno. Se dejó secar al aire y se tiñó con Diff-Quik a temperatura ambiente. Se observaron las muestras por microscopio de contraste de fases a inmersión 100X. Se contaron 500 espermatozoides por duplicado y se procedió a calcular el DIF con la siguiente fórmula:

$$DIF (\%) = 100 \times \frac{\text{Número de espermatozoides con fragmentación en el DNA}}{\text{Número total de espermatozoides}}$$

La muestra recuperada del swim-up se llevó al embriólogo quien llevó a cabo la selección manual del espermatozoide para ser utilizado en el proceso de ICSI. Al realizarse esta técnica, se evaluó el resultado de la fecundación *in vivo* 18 horas posteriores a la inyección, observando la presencia de dos cuerpos polares y pronúcleos. Se verificó la calidad de los ovocitos obtenidos de la aspiración folicular por el embriólogo, así como la revisión de la información del expediente clínico para capturar la información de los pacientes en la realización del ciclo de fertilización *in vitro*.

## 9.8 Preparación de los ovocitos por parte del embriólogo

La estimulación ovárica controlada para la obtención de los ovocitos que se usaron para la obtención de los ovocitos que se usaron para el procedimiento de ICSI, fue realizada por el médico tratante. Los ovocitos se obtuvieron por medio de aspiración o punción folicular. Se utilizaron micropipetas de sujeción y microinyección para sostener el ovocito e inyectar el espermatozoide (COOK Medical, EE. UU.). El ovocito se unió a la pipeta de sujeción mediante una ligera presión negativa.

## 9.10 Desarrollo embrionario

De dieciséis a dieciocho horas después de la microinyección, se evaluó la fecundación de ovocitos (dos cuerpos polares/dos pronúcleos) hasta treinta dos a treinta seis horas post-fecundación (día 2) del desarrollo embrionario (cuatro blastómeros).

## 9.11 Análisis estadístico

Para el análisis de datos se utilizó una hoja de cálculo de Microsoft Excel para MacOS. La normalidad de los datos se comprobó mediante una prueba de Shapiro-Wilk. Se presentan datos como (media  $\pm$  desviación estándar). La comparación de ambos grupos (donantes y pacientes) se analizó mediante una prueba no-paramétrica U-de-Mann-Whitney, una probabilidad = 0.00 determinó diferencias significativas. Los coeficientes de correlación de Spearman también se calcularon y una probabilidad de  $<0.05$  determinó diferencias significativas. Valores de  $r$  positivos cercanos a 1 tienen una correlación fuerte entre los grupos, mientras una variable incrementa se espera que el valor de la segunda variable también incrementa. Si una variable incrementa y la otra variable disminuye, el valor de  $r$  será más cercano a menos 1, teniendo una correlación negativa. El valor de  $p$  demuestra si hay una correlación significativa y no es debido al azar.

## 10. Resultados

Se analizaron 52 pacientes y 41 donantes en este estudio. La **Tabla 1** muestra diferencias significativas ( $p = 0.00$ ) en la edad de los pacientes, volumen del eyaculado seminal (ml), concentración espermática ( $10^6/\text{ml}$ ), en el porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos o tipo A+B (OMS, 2021) e inmóviles o tipo D (OMS, 2021) de los espermatozoides y espermatozoides normales (%) los cuales fueron valores menores en los pacientes que en los donantes. El porcentaje de DFI en fresco y post-capacitación fue mayor en los pacientes que en los donantes con diferencias significativas en el porcentaje DFI post-capacitación ( $p < 0.05$ ). Existe una correlación negativa (**Tabla 2**) entre los parámetros morfológicos volumen del eyaculado (ml) concentración espermática ( $10^6/\text{ml}$ ), porcentaje de móviles progresivos, así como el porcentaje espermatozoides móviles progresivos con el porcentaje DIF sin diferencias significativas (**Tabla 2**). En cuanto el parámetro del porcentaje de espermatozoides inmóviles se correlaciona positivamente con el porcentaje de DFI con diferencias significativas en donantes de  $r = 0.45$   $p < 0.05$ .

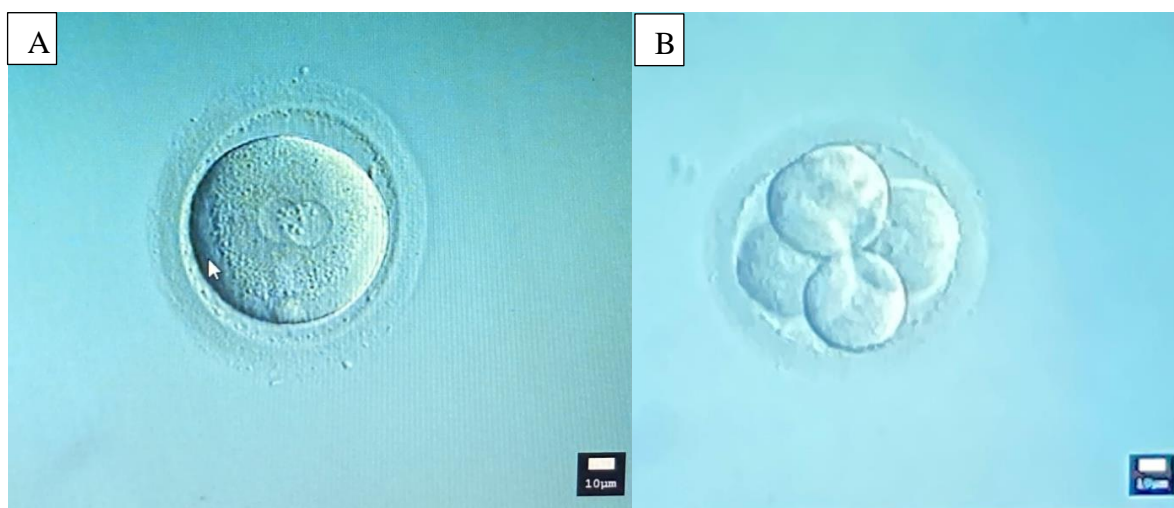
**Tabla 1** Comparación de los seminogramas entre el grupo donante y paciente

Parámetros	Donantes Media $\pm$ DE	Pacientes Media $\pm$ DE	p
n	41	52	
Volumen (ml)	3.50 $\pm$ 1.32	2.49 $\pm$ 1.03	0.0
Concentración ( $10^6/\text{ml}$ )	73.49 $\pm$ 12.11	44.90 $\pm$ 23.24	0.0
Móviles Progresivos (%) o A+B	49 $\pm$ 12.47	38.69 $\pm$ 13.86	0.0
Móviles No Progresivos (%) o C	27.80 $\pm$ 15.50	13 $\pm$ 3.37	0.0
Inmóviles (%) o D	23.24 $\pm$ 15.90	47.08 $\pm$ 11.56	0.0
Totales Móviles Progresivos (%)	131.12 $\pm$ 71.92	50.10 $\pm$ 47.02	0.0
Morfología Normal (%)	5.28 $\pm$ 1.88	2.10 $\pm$ 0.93	0.0
Morfología Anormal (%)	94.76 $\pm$ 1.87	97.90 $\pm$ 0.93	0.0
DFI (%)	23.82 $\pm$ 3.64	29.47 $\pm$ 8.37	0.0
DFI (%) Post-Capacitación	12.04 $\pm$ 3.21	14.47 $\pm$ 4.69	0.01

**Tabla 2** Correlación entre los parámetros del análisis seminal con el porcentaje de DFI

Parámetro		Donante	Paciente
Volumen (ml)	r=	-0.08	-0.03
	p=	0.68	0.81
Concentración (10 <sup>6</sup> /ml)	r=	-0.17	-0.18
	p=	0.36	0.21
Móviles Progresivos (%)	r=	-0.07	-0.03
	p=	0.71	0.83
Inmóviles	r=	<b>0.45</b>	0.08
	p=	<b>0.01*</b>	0.59
Totales Móviles Progresivos (%)	r=	-0.03	-0.06
	p=	0.90	0.68

La **Figura 6** ilustra un cigoto fecundado. Se puede observar la presencia de dos pronúcleos, el masculino y femenino, así como, la presencia de dos cuerpos polares; en un embrión de día dos se observan cuatro blastómeros. La tasa de fecundación (%) fue de un  $66 \pm 29.4$  en los donantes y de  $76 \pm 28.4$  en los pacientes de ICSI (Tabla 3).



**Figura 6** Resultados del ICSI. A) fertilización, presencia de dos pronúcleos (fusión del pronúcleo femenino y masculino) y dos cuerpos polares (solo visible uno). B) embrión día dos, presencia de cuatro blastómeros

Se obtuvieron en promedio nueve ovocitos en el caso de donantes y de estos, 2 llegaron a ser embriones de cuatro blastómeros; en el caso de pacientes se obtuvieron en promedio diez ovocitos y de éstos, cuatro se desarrollaron a embriones de cuatro



blastómeros (**Tabla 3**). La correlación entre la tasa de fecundación y los seminogramas de los pacientes se presenta en la **Tabla 4**. La tasa de fecundación se correlaciona positivamente con el volumen, así como en la concentración, totales móviles progresivos, porcentaje de móviles no progresivos y formas normales, aunque no se encontraron diferencias significativas entre las correlaciones de estos datos. Por otro lado, hay una correlación negativa entre los espermatozoides inmóviles y porcentaje de DIF sin diferencias significativas.

**Tabla 3** Comparación donante-paciente de los resultados de los ICSI realizados

Parámetros	Media $\pm$ DE		p
	Donantes	Pacientes	
<b>n</b>	11	43	
<b>ovocitos colectados</b>	9 $\pm$ 7.3	10 $\pm$ 6.9	0.38
<b>ovocitos inyectados</b>	7 $\pm$ 5.8	8 $\pm$ 5.61	0.54
<b>Tasa de Fecundación (%)</b>	66 $\pm$ 29.4	76 $\pm$ 28.4	0.46
<b>Fecundados</b>	6 (54.5%)	7 (16.2%)	0.64
<b>Embriones día 2</b>	2 (18.2%)	4 (9.3%)	0.23

**Tabla 4** Coeficiente de correlación entre los parámetros del seminograma y tasa de fecundación de los pacientes

Parámetro	r	p
<b>Concentración (<math>10^6</math>/ml)</b>	0.136	0.383
<b>Móviles Progresivos (%)</b>	0.118	0.452
<b>Móviles No Progresivos (%)</b>	0.100	0.523
<b>Inmóviles (%)</b>	-0.098	0.531
<b>Totales Móviles Progresivos (%)</b>	0.160	0.306
<b>Formas normales (%)</b>	0.074	0.636
<b>DIF %</b>	-0.114	0.22

## 11. Discusión y conclusión

Los pacientes que acuden a una clínica de reproducción asistida son aquellos que no han podido lograr un embarazo a lo largo de un año de haber tenido relaciones sexuales sin protección (WHO, 2021). Es posible determinar el tipo de infertilidad, si es por factor masculino o femenino mediante diferentes pruebas de gabinete (Irvine, et al., 2000; Jeremias, et al., 2021; Kim, et al., 2017; Lakshamanan, et al., 2020; Lu, et al., 2018; Portella-Ruiz & Gonzales, 2016). El presente trabajo analiza el factor masculino y cómo influyen algunos parámetros seminales en el resultado de ICSI (Steger, et al., 2010).

Al comparar los parámetros donante-paciente, se observan valores menores en los pacientes que en los donantes (**Tabla 1**) con una diferencia significativa ( $p=0.00$ ) en todos los parámetros excluyendo el DFI post-capacitación. La calidad seminal depende de una serie de factores intrínsecos y extrínsecos. En cuanto a la edad, Pino y colaboradores (2020) reportan que la edad no es un parámetro que dependa del éxito de una técnica de reproducción asistida, ya que, al analizar la calidad seminal en muestras de varones de 21 hasta mayores de 50 años, encuentran una correlación negativa entre la edad con el volumen, concentración y movilidad, encontrándose datos similares en este estudio, ya que, la edad promedio de los donantes y pacientes infértiles fue de 36 y 40 años respectivamente. De lo contrario, se ha observado que factores extrínsecos, como son contaminantes en el aire (Acosta Campos, et al., 2016; Selvaraju, et al., 2021), influyen sinérgicamente con factores intrínsecos, como son, infecciones genitourinarias, toxinas entre otras, y propician la presencia de ERO (Acosta Campos, et al., 2021; Lakshamanan, et al., 2020; Yilmaz, et al., 2010). Daños y alteraciones en la próstata y en vesículas seminales provocan cambios en el líquido seminal donde se encuentran los espermatozoides (Pino, et al., 2020) y a nivel de maduración espermática pueden ocasionar una protaminación inadecuada durante el tránsito de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos (Lakshamanan, et al., 2020; Yilmaz, et al., 2010).

Una calidad seminal disminuida evidenciada por una disminución en la movilidad, incremento de espermatozoide inmóviles y pocos espermatozoides morfológicamente

normales podría ser indicativo de que no se cuenta con un DNA íntegro (Saleh, et al., 2002). Los resultados de este estudio muestran una correlación negativa con el volumen del eyaculado, concentración, espermatozoides móviles progresivos y totales móviles progresivos con el DFI en los varones, lo que concuerda con lo encontrado por Lu y colaboradores (2018), Pino y colaboradores (2020), Muriel y colaboradores (2006) y Tam Le y colaboradores (2019), ya que al analizar la muestra obtenida observaron bajos niveles en estos parámetros, con un DFI elevado y por consecuencia con mayor daño al DNA.

Durante la fase acrosómica de la espermiogénesis, se empieza la compactación de la cromatina por lo que la cabeza presenta cambios tanto morfológicos como moleculares, las mitocondrias migran hacia la pieza media y la cola (flagelo) se empieza alargar, alteraciones morfológicas en esta etapa modifican la función de estas estructuras (Tam Le, et al., 2019). Debido a ello, se debe determinar no sólo la calidad seminal, sino también las alteraciones a nivel molecular (Lakshamanan, et al., 2020); el DFI nos indica el porcentaje de daño presente en los espermatozoides, valores que se encuentran elevados principalmente en los pacientes. Según los datos obtenidos en este estudio, hay una correlación positiva con el DFI y la movilidad (**Tabla 2**). En la presencia de un mayor número de espermatozoides inmóviles podríamos esperar un mayor DFI. Petersen y colaboradores (2018) detallan la importancia de las mitocondrias de la pieza media, ya que en la pieza media se encuentran las mitocondrias que se encargan de propiciar la energía para la movilidad del espermatozoide, que a su vez es una fuente de producción de ERO que en exceso pueden dañar la membrana del espermatozoide y la cromatina (Oliveira & Alves, 2015; Petersen, et al., 2018)

Según los resultados de la calidad seminal, se procede a la selección espermática (capacitación), para poder segregar los mejores espermatozoides y así lograr el éxito en los procedimientos (Irvine, et al., 2000). Irvine y colaboradores (2000) detallan que en los pacientes infértiles se encuentra un mayor grado de daño al DNA por ERO en comparación con los donantes, más si la muestra obtenida contiene leucocitos, ya que se ha comprobado que la presencia de una infección bacteriana altera la proporción de protaminas (I y II) en el DNA (Zeyad, et al., 2018). Al realizar una prueba SCD en

pacientes con varicocele, se pueden presentar altos niveles de ERO y disminución de la capacidad anti-oxidante. Debido a la dilatación de las venas testiculares se han detectado altos niveles de óxido nítrico el cual puede reaccionar con el superóxido y producir peroxinitrato, un oxidante potente, induciendo estrés oxidante en el testículo (Gosálvez, et al., 2014; Lakshamanan, et al., 2020; Steger, et al., 2010). Hay una correlación negativa débil con los parámetros de volumen, concentración, móviles progresivos y totales de móviles progresivos con el DFI, indicando que si se encuentra un mayor valor en estos parámetros se espera que haya menor fragmentación en los espermatozoides (Evgeni, et al., 2014; Tam Le, et al., 2019). Cuando la calidad de los espermatozoides es baja y el DFI es alto en las muestras en fresco, se realiza el procedimiento de ICSI (Kim, et al., 2017).

Las técnicas de reproducción asistida contrarrestan los problemas de infertilidad, ya que por medio de una selección espermática adecuada (gradientes de densidad y swim-up), se obtienen los mejores espermatozoides para llevar a cabo el ICSI (Kim, et al., 2017; Portella-Ruiz & Gonzales, 2016; Simon, et al., 2017; Zeyad, et al., 2018). Como se mencionó anteriormente, la movilidad se correlaciona negativamente con el DFI, por lo que, los espermatozoides con baja fragmentación tendrán una alta movilidad progresiva (Battin, et al., 1985). Un ovocito maduro se caracteriza por presentar un cuerpo polar y un ovoplasma homogéneo, no se procede a la inyección del espermatozoide si el ovocito no presenta estas características (Kim, et al., 2017). 18 horas post-inyección, los cigotos (**Figura 6A**) presentan dos cuerpos polares y dos pronúcleos (masculino y femenino); el factor masculino se puede observar hasta el día dos, ya que el genoma propio del embrión se activa en el día tres (Yilmaz, et al., 2010). No hay diferencias significativas en la tasa de fecundación, desarrollo y calidad embrionaria entre el donante y paciente debido a que ambos presentan un DFI bajo post-capacitación (Portella-Ruiz & Gonzales, 2016; Simon, et al., 2017). Yilmaz y colaboradores (2010) no encontraron diferencias significativas entre los grupos con un DFI más alto y otro con un DFI más bajo al momento de realizar ICSI con los espermatozoides de estos grupos, argumentan que el ovocito y posteriormente el embrión poseen factores de reparación del DNA del genoma paterno (Ahmadi & Ng, 1999; Lakshamanan, et al., 2020). Reiterando, los daños comunes en el

DNA son de rompimiento de cadena sencilla y de doble cadena, por lo que el ovocito puede reparar daños en la cadena sencilla a través de la ruta de escisión de bases antes de la fusión de la cromatina. En cuanto a daños de doble cadena, estos son reparados por el cigoto a través de recombinación homóloga (Lakshamanan, et al., 2020). Cabe destacar que en el presente estudio se observó una correlación negativa débil en el alto porcentaje de espermatozoides inmóviles y un DFI alto con la tasa de fertilización, aunque sin diferencias significativas. Simon & Lewis, 2011 indican que la reparación por parte del ovocito está limitada al nivel incrementado de DFI, también mencionan que un espermatozoide con una fragmentación del DNA aumentada no pueda descompactarse, por lo que no se observen los pronúcleos. Estos datos demuestran la importancia de realizar una selección espermática óptima. Según la calidad de la muestra, determinar el grosor de los gradientes de densidad y a cuánto tiempo y en qué condiciones implementar el swim-up, (ya sea en calor o en temperatura ambiente) para tener el mejor espermatozoide que se usará para el procedimiento de ICSI (Holstein, et al., 2003).

## 11.1 Conclusiones

Se ha demostrado que los casos de infertilidad incluyen casos por factor masculino, ya que al analizar las muestras seminales de los varones que acuden a la clínica junto con su pareja al no ser capaces de lograr el embarazo después de un año de tener relaciones sexuales sin protección, se encuentran las muestras con parámetros de la calidad seminal bajos en comparación con los donantes que acuden a la clínica. El porcentaje de espermatozoides inmóviles y morfológicamente anormales tiene una correlación positiva con el DFI, por lo que se ve afectada la cantidad de ovocitos fecundados y posteriormente su desarrollo embrionario al día dos. Mediante la selección espermática, ya sea con gradientes densidad o swim-up, se logra obtener espermatozoides con un % DFI menor (tasa de fecundación alta) tanto en pacientes como en donantes (tasa de fecundación excelente). Debido a que se logra obtener espermatozoides con un daño al DNA bajo, se logró tener una tasa de fecundación mayor del 70% en los pacientes infértiles. Dado que el factor masculino influye en el desarrollo embrionario hasta el día

dos (posteriormente se activa el genoma propio del embrión), se obtuvieron resultados favorables de embriones fecundados con espermatozoides de procedencia heterogénea (donante) del 18% y de pacientes del 9%, comprobando la importancia de emplear las técnicas de selección adecuadamente, así como realizar la prueba de fragmentación al DNA, para poder mejorar las tasas de fertilización y la calidad embrionaria.

## 12. Anexo

### Mann-Whitney Test: Calidad seminal Donante- Paciente

PARÁMETRO	ID	SUM RANK	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	p
EDAD	DONANTE	899.5	434.5	899.5	-3.333	<0.001
	PACIENTE	2503.5				
VOLUMEN	DONANTE	2446.5	546.5	1924.5	-4.038	<0.001
	PACIENTE	1924.5				
CONCENTRACIÓN	DONANTE	2695	298	1676	-5.945	<0.001
	PACIENTE	1676				
PROGRESIVOS	DONANTE	2391.5	601.5	1979.5	-3.598	<0.001
	PACIENTE	1979.5				
NO PROGRESIVOS	DONANTE	2452.5	540.5	1918.5	-4.076	<0.001
	PACIENTE	1918.5				
INMÓVIL	DONANTE	1194.5	333.5	1194.5	-5.672	<0.001
	PACIENTE	3176.5				
TMP	DONANTE	2693	300	1678	-5.927	<0.001
	PACIENTE	1678				
NORMALES	DONANTE	2948.5	44.5	1422.5	-8.055	<0.001
	PACIENTE	1422.5				
ANORMALES	DONANTE	905.5	44.5	905.5	-8.055	<0.001
	PACIENTE	3465.5				
DFI	DONANTE	890.5	425.5	890.5	-3.413	<0.001
	PACIENTE	2512.5				
DFI POST-CAP	DONANTE	982	517	982	-2.534	0.011
	PACIENTE	2421				

### Mann-Whitney Test: Resultado de ICSI, Donante-Paciente

PARÁMETRO	ID	SUM RANK	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	p
OVOCITOS OBTENIDOS	DONANTE	290.5	224.5	290.5	-0.862	0.389
	PACIENTE	1539.5				
OVOCITOS INYECTADOS	DONANTE	303.5	237.5	303.5	-0.613	0.54
	PACIENTE	1526.5				
FECUNDADOS	DONANTE	311.5	245.5	311.5	-0.46	0.645
	PACIENTE	1518.5				
DÍA 2	DONANTE	274.5	208.5	274.5	-1.177	0.239
	PACIENTE	1555.5				
TASA DE FECUNDACIÓN	DONANTE	298	232	298	-0.73	0.465
	PACIENTE	1532				



### 13. Literatura Citada

1. Acosta Campos, L. G. y otros, 2021. Correlation between sperm DNA fragmentation index and semen parameters in 418 men seen at a fertility center. *JBRA Assited Reproduction* , 25(3), pp. 349-357.
2. Acosta Campos, L. G. y otros, 2016. Evaluación de los parámetros seminales en varones atendidos en centros de fertilidad de Perú y México. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 33(2), pp. 25-30.
3. Agarwal, A., Aitken, R. J. & Alvarez, J. G., 2012. Studies on men's health and fertility.. *Studies on Men's Health and Fertility*, pp. 1-671.
4. Agarwal, A., Cho, C.-L. & Esteves, S. C., 2016. Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation?. *Wolters Kluwer Health*, pp. 164-171.
5. Agarwal, A. y otros, 2016. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, pp. 935-950.
6. Ahmadi, A. & Ng, S.-C., 1999. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Human Reproduction*, 14(9), pp. 2279-2285.
7. Akmal, M. y otros, 2016. The important role of protamine in spermatogenesis and quality of sperm: a mini review. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(5), pp. 357-360.
8. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. & al, e., 2002. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. New York: Garland Science. Primordial Germ Cells and Sex Determination in Mammals. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26940/>.
9. Avidor-Reiss, T., Carr, A. & Fishman, E. L., 2020. The sperm centrioles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, pp. 1-12.
10. Barbagallo, F. y otros, 2021. The relationship between seminal fluid hyperviscosity and oxidative stress: A systematic review. *Antioxidants*, 10(356), pp. 1-13.
11. Barroso Villa, G., 2019. *La legislación en materia de infertilidad y de reproducción asistida*. Ciudad de México, Academia Nacional de Medicina de México.
12. Battin, D. y otros, 1985. The correlation between in vitro fertilization of human oocytes and semen profile. *Fertility and sterility*, 44(6), pp. 835-838.
13. Benchaib, M. y otros, 2007. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility*, pp. 93-100.
14. Bianchi, E. y otros, 2021. Highly conserved sperm function-related transcripts across three species: human, rat and mouse. *Reproductive Toxicology*, pp. 44-51.
15. Boone, J. F., 1989. *Fisiología y Anatomía Animal*. México, D.F.: El Manual Moderno.
16. Bosco, L. y otros, 2018. Sperm DNA fragmentation: An early and reliable marker of air pollution. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, pp. 243-249.
17. Brewer, L., Corzett, M. & Balhorn, R., 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(41), pp. 38895-38900.
18. Brovko, A. A., Tavokina, L. T. & Sopko, Y. A., 2009. Genetic Factors of Male Infertility. The Role of Complex Examination in the Case of Spermatogenesis Disturbances. *Cytology and Genetics*, pp. 360-365.
19. Brunekreef, B. & Holgate, S. T., 2002. Air pollution and health. *Lancet* 360, pp. 1233-1242.

20. Cantabria, U. d., 2017. *Tema 7. Sistema reproductor*. [En línea] Available at: <https://ocw.unican.es/mod/page/view.php?id=588>
21. Carreau, S., Wolczynski, S. & Galeraud-Denis, I., 2010. Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Philosophical transactions of the royal society*, pp. 1571-1579.
22. Carrell, D. T. & Liu, L., 2001. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *Journal of Andrology*, pp. 604-610.
23. Carrell, D. T., Emery, B. R. & Hammoud, S., 2007. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?. *Human Reproduction Update*, pp. 313-327.
24. Champroux, A. y otros, 2018. A decade of exploring the mammalian sperm epigenome: Paternal epigenetic and transgenerational inheritance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(50), pp. 1-19.
25. Chen, H., Mruk, D., Xiao, X. & Cheng, C. Y., 2017. Human Spermatogenesis and Its Regulation. En: *Male Hypogonadism*. New York: Springer International Publishing, pp. 49-72.
26. Cho, C. L., Esteves, S. C. & Agarwal, A., 2016. Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian Journal of Andrology*, pp. 186-193.
27. Chohan, K. R. y otros, 2006. Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *Andrology*, 27(1), pp. 53-59.
28. Collins, J. A., Barnhart, K. T. & Schlegel, P. N., 2008. Do sperm DNA integrity test predict pregnancy with in vitro fertilization?. *Fertility and Sterility*, pp. 823-831.
29. Dacheux, J.-L. & Dacheux, F., 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, Volumen 147, pp. 27-42.
30. de Mateo, S. & Sassone-Corsi, P., 2014. Regulation of spermatogenesis by small non-coding RNAs: Role of the germ granule. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, pp. 84-92.
31. de Rooij, D. G., 2017. Organization of the Seminiferous Epithelium and the Cycle, and Morphometric Description of Spermatogonial Subtypes (Rodents and Primates). En: *The Biology of Mammalian Spermatogonia*. New York: Springer Nature, pp. 03-15.
32. Dioni, L. y otros, 2011. Effects of short-term exposure to inhalable particulate matter on telomere length, telomere expression, and telomerase methylation in steel workers. *Environmental Health Perspect*, pp. 622-627.
33. Dos Santos Hamilton, T. R. & Ortiz D'Ávila Assumpção, M. E., 2019. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote*, pp. 1-8.
34. Dufau, M. L., 1998. The Luteinizing Hormone Receptor. *Annu. Rev. Physiol*, Issue 60, pp. 461-495.
35. Eliasson, R., 2010. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian Journal of Andrology*, pp. 26-32.
36. Esteves, S. C., 2019. Interventions to Prevent Sperm DNA Damage Effects on Reproduction. En: *Genetic Damage in Human Spermatozoa*. Switzerland: Springer Nature Switzerland, pp. 119-148.

37. Evenson, D. P., 2017. Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Translation Andrology and Urology*, pp. 495-500.
38. Evgeni, E., Charalabopoulos, K. & Asimakopoulos, B., 2014. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil*, pp. 2-14.
39. Fernández, J. L. y otros, 2005. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*, pp. 833-842.
40. Flück, C. E. & Pandey, A. V., 2017. Testicular Steroidogenesis. En: *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. s.l.:Endocrinology, Springer, Cham, pp. 343-371.
41. Foster, R. A., 2017. Male Reproductive System. *Pathologic basis of veterinary disease*, pp. 1194-1222.
42. Gao, H., Khawar, M. B. & Li, W., 2019. Autophagy in Reproduction. En: *Autophagy: Biology and Diseases*. Beijing, China: Springer Nature, pp. 453-468.
43. Goodman, H. M., 2009. Chapter 12: Hormonal Control of Reproduction in the Male. En: *Basic Medical Endocrinology*. s.l.:Academic Press, pp. 239-256.
44. Gosálvez, J. y otros, 2014. Characterisation of a subpopulation of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the sperm chromatin dispersion test. *Andrologia*, Volumen 46, pp. 602-609.
45. Govin, J. y otros, 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem*, Volumen 271, pp. 3459-3469.
46. Hao, S.-L., Ni, F.-D. & Yang, W.-X., 2019. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, pp. 201-210.
47. Hinson, J., Raven, P. & Chew, S., 2010. Chapter 8: Hormon Control of Reproduction Part I: Male Reproductive System. En: *The Endocrine System*. s.l.:Churchill Livingstone, pp. 87-98.
48. Holstein, A.-F., Schulze, W. & Davidoff, M., 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive biology and endocrinology*, pp. 1-16.
49. Holt, E. H. y otros, 2022. Hormonal control of reproduction in the male. En: *Goodman's Basic Medical Endocrinology*. Cambridge, MA: Elsevier, pp. 381-431.
50. Irvine, S. D. y otros, 2000. DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. *Andrology*, 21(1), pp. 33-44.
51. James, E. R. y otros, 2020. The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 1-17.
52. Jeremias, J. T. y otros, 2021. Oxidative origen of sperm DNA fragmentation in the adult varicocele. *Int Braz J Urol*, pp. 275-283.
53. Jodar, M. & Olivia, R., 2014. Protamine Alterations in Human Spermatozoa. En: *Genetic Damage in Human Spermatozoa*. Florence, Italy: Springer, pp. 83-102.
54. Jones, R. E. & Lopez, K. H., 2014. Chapter 4- The Male Reproductive System. En: *Human Reproductive Biology (fourth edition)*. s.l.:Academic Press, pp. 67-83.
55. Khawar, M. B., Gao, H. & Li, W., 2019. Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *frontiers in Cell and Development Biology*, pp. 1-12.

56. Kim, G. Y., 2018. What should be done for men with sperm DNA fragmentation?. *The Korean Society for Reproductive Medicine*, pp. 101-109.
57. Kim, H. J. y otros, 2017. Evaluation of human embryo development in in vitro fertilization-and intracytoplasmic sperm injection-fertilized oocytes: A time-lapse study. *Clin Exp Reprod Med*, 44(2), pp. 90-95.
58. Lakshamanan, S., Mahalakshmi, S., Ramya, H. & Nidhi, S., 2020. Effect of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome: A prospective study. *Clinical Journal of Obstetrics and Gynecology*, pp. 127-131.
59. Lewis, J. D. y otros, 2004. Histone H1 and the origin of protamines. *PNAS*, pp. 4148-4152.
60. Liffner, S. y otros, 2019. Diagnostics of DNA fragmentation in human spermatozoa: Are sperm chromatin structure analysis and sperm chromatin dispersion test (SCD-haloSpermG2®) comparable?. *Andrologia*, pp. 1-9.
61. Li, L. y otros, 2017. Sperm Release at Spermiation Is Regulated by Changes in the Organization of Actin-and Microtubule-Based Cytoskeletons at the Apical Ectoplasmic Specialization-A Study Using the Adjudin Model. *Endocrinology*, pp. 4300-4316.
62. Lu, J.-C.y otros, 2018. Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(23), pp. 2-9.
63. Luo, L.-F., Hou, C.-C. & Yang, W.-X., 2016. Small non-coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis. *Gene*, pp. 141-157.
64. Mesiano, S. & Jones, E. E., 2017. The Male Reproduction System. En: *Medical Physiology*. s.l.:Elsevier, pp. 1092-1107.
65. Mishra, A. K. y otros, 2018. Insights into pH regulatory mechanisms in mediating spermatozoa functions. *Veterinary World*, 11(6), pp. 852-858.
66. Muriel, L. y otros, 2006. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Human Reproduction*, 21(3), pp. 738-744.
67. Nigg, E. A. & Raff, J. W., 2009. Centrioles, Centrosomes, and Cilia in Health and Disease. *Cell* 139, pp. 663-678.
68. Ntemou, E. y otros, 2019. Oncofertility: Pharmacological Protection and Immature Testicular Tissue (ITT)- Based Strategies for Prepubertal and Adolescente Male Cancer Patients. *Intenational Journal of Molecular Sciences*.
69. Oehninger, S. & Kruger, T. F., 2021. Sperm morphology and its disorders in the context of infertility. *American Society for Reproductive Medicine*, pp. 75-92.
70. Oliva, R., 2006. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, pp. 417-435.
71. Oliveira, P. F. & Alves, M. G., 2015. *Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis*. Portugal: SpringerBriefs in Cell Biology.
72. Petersen, C. G. y otros, 2018. The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples. *JBRA assisted reproduction*, 22(4), pp. 323-330.
73. Pino, V. y otros, 2020. The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *JBRA Assisted Reproduction*, 24(1), pp. 82-86.

74. Poiani, A., 2006. Complexity of Seminal Fluid: A Review. *Behav Ecol Sociobiol*, pp. 289-310.
75. Portella-Ruiz, J. R. & Gonzales, G. F., 2016. Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Ginecología obstétrica México*, pp. 462-473.
76. Ren, D. y otros, 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, Volumen 413, pp. 603-609.
77. Rolland, A. D., Jégou, B. & Pineau, C., 2008. Hormonal Regulation in Spermatogenesis. En: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Austin, Texas: Springer Science, pp. 29-31.
78. Roque, M. & Esteves, S. C., 2018. Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: A review. *International Urology and Nephrology*, pp. 583-603.
79. Saleh, R. A. y otros, 2002. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility*, pp. 313-318.
80. Sanocka, D. & Kurpisz, M., 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive biology and endocrinology*, 2(12).
81. Sedes, L. y otros, 2018. Cholesterol: A Gatekeeper of Male Fertility?. *frontiers in Endocrinology*, pp. 1-13.
82. Selvaraju, V., Baskaran, S., Agarwal, A. & Henkel, R., 2021. Environmental contaminants and male infertility: Effects and mechanisms. *Andrologia*, Volumen 53, pp. 1-13.
83. Sharma, M. & Kumar, A., 2017. The Sperm. En: *Basics of Human Andrology*. New Delhi, India: Springer, pp. 171-204.
84. Sharma, R. & Agarwal, A., 2011. Spermatogenesis: An Overview. En: A. Zini & A. Agarwal, edits. *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. Cleaveland, OH: Springer Science, pp. 19-44.
85. Shetty, N. K., 2018. Inheritance of chromosomes, sex determination, and the human genome: A new paradigm. *Gender and Genome*, pp. 16-26.
86. Shpakov, A. O., Derkach, K. V., Bakhtyukov, A. A. & Dar'in, D. V., 2020. The low-molecular-weight ligands of the gonadotropin receptors as the new generation of the regulators of the reproductive functions and steroidogenesis. En: N. Sharma, S. Chakrabarti, Y. Barak & A. Ellenbogen, edits. *Innovations in assisted reproduction technology*. London: IntechO, pp. 1-21.
87. Simon, L., Emery, B. R. & Carrell, D. T., 2017. Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, pp. 38-56.
88. Simon, L. & Lewis, S. E. M., 2011. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is better predictor of fertilization in vitro?. *Systems in biology in reproductive medicine*, Volumen 57, pp. 133-138.
89. Smith, L. B. & Walker, W. H., 2014. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in cell & Developmental Biology*, pp. 2-13.
90. Spiropoulos, J., Turnbull, D. M. & Chinnery, P. F., 2002. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction?. *Molecular Human Reproduction*, pp. 719-721.

91. Steger, K., Cavalcanti, M. C. & Schuppe, H. C., 2010. Prognostic markers for competent human spermatozoa: fertilizing capacity and contribution to the embryo. *International Journal of Andrology*, pp. 513-527.
92. Sullivan, R. y otros, 2019. Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology*, Volumen 7, pp. 748-757.
93. Takeshima, T. y otros, 2020. Oxidative stress and male infertility. *Reproductive Medicine and Biology*, Volumen 20, pp. 41-52.
94. Tam Le, M. y otros, 2019. Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters?. *Reproductive medicine and biology*, Volumen 18, pp. 390-396.
95. Torres-Flores, U. & Hernández-Hernández, A., 2020. The interplay between replacement and retention of histones in the sperm genome. *Frontiers in Genetics*, 11(780), pp. 1-9.
96. Twigg, J. P., Irvine, D. S. & Aitken, R. J., 1998. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* , pp. 1864-1871.
97. Unger, N. y otros, 2010. Attribution of climate forcing to economic sectors. *Proct. Natl. Acad. Sci.*, p. 107.
98. Vecoli, C. y otros, 2017. Effects of highly polluted environment on sperm telomere length: a pilot. *International Journal of Molecular Science*, pp. 1703-1711.
99. Vertika, S., Singh, K. K. & Rajender, S., 2020. Mitochondria, Spermatogenesis, and male infertility - An update. *Mitochondrion*, pp. 26-40.
100. Wang, T., Gao, H., Li, W. & Liu, C., 2019. Essential Role of Histone Replacement and Modifications in Male Fertility. *Frontiers in Genetics*, pp. 1-15.
101. Weichert, C. K., 1986. *Elementos de Anatomía de los Cordados*. España: McGraw-Hill.
102. World Health Organization, 2021. *WHO Laboratory Manual for the examination of Human Semen. 6ta ed.*, Cambridge, UK: Cambridge University Press.
103. Yang, Q. y otros, 2015. Sperm telomere length is positively associated with the quality of early embryonic development. *Human Reproduction* , pp. 1876-1881.
104. Yilmaz, S. y otros, 2010. Effects of Sperm DNA Fragmentation on Semen Parameters and ICSI outcome Determined by an Improved SCD Test, Halosperm. *Fertility and Sterility* , 4(2), pp. 73-78.
105. Yoshida, K. y otros, 2018. Mapping of histone-binding sites in histone replacement-completed spermatozoa. *Nature Communications* , 9(3885), pp. 1-11.
106. Zeyad, A., Hamad, M., Amor, H. & Hammadeh, M. E., 2018. Relationships between bacteriosperma, DNA integrity, nuclear protamine alteration, sperm quality and ICSI outcome. *Reproductive Biology*, Volumen 18, pp. 115-121.
107. Zhang, X., Gabriel, M. S. & Zini, A., 2006. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *Journal of Andrology*, 27(3), pp. 414-420.
108. Zhou, J. y otros, 2015. The semen pH affects sperm motility and capacitation. *PLoS ONE* , 10(7), pp. 1-15.
109. Zhou, R. y otros, 2019. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 2681-2695.

110. Zini, A., Bielecki, R., Phang, D. & Zenzes, M. T., 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 75(4), pp. 674-677.



Determinación de la Calidad Seminal, Daño al DNA espermático y su Relación en la Fecundación y Desarrollo Embrionario (Día 2) en Pacientes con Problemas Reproductivos.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 13 del mes de febrero del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
- DR. RODOLFO CANSECO SEDANO
- DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
- DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

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:


MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: REBECA AVELLANEDA REAL

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**

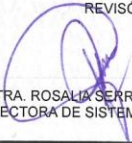
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



*Rebeca Avellaneda Real*


REBECA AVELLANEDA REAL  
ALUMNA

REVISÓ



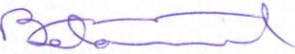
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE




DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL




DR. RODOLFO CANSECO SEDANO

VOCAL



DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

SECRETARIO



DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA