

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



**RELACIÓN ENTRE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO
CON LOS PARÁMETROS SEMINALES RUTINARIAMENTE ESTUDIADOS
EN PACIENTES DE UNA CLÍNICA DE FERTILIDAD EN LIMA, PERÚ**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL TÍTULO
PROFESIONAL DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

AUTOR:

IVI MARGGIE FIGUEROA REÁTEGUI

ASESORA:

DRA. CARLA JEANNINE GONZALES ARIMBORGO

LIMA – PERÚ

2021

REVISORES

Ph.D. Carlos A. Tirado

Ph.D. Raúl A. Loayza Muro

ASESORA

Dra. Carla Jeannine Gonzales Arimborgo

**Dedicado a todos los que siguen luchando en silencio, Dios siempre es y será el
camino.**

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo de suficiencia profesional fue culminado y llegado a sus manos gracias a personas muy importantes que siempre confiaron en mí e hicieron este proceso más especial. Por ellas, me tomo estas breves líneas de agradecimiento.

- A Dios, porque todo lo que soy y lo que seré se lo debo a Él.
- A mis padres Ricardo Figueroa y Jessica Reátegui, porque son el mejor equipo que puede existir, siempre confiaron en mis habilidades y me dan su amor infinito cada día.
- A mi asesora, la Dra. Carla Gonzáles Arimborgo por sus ánimos, apoyo y amistad desde el comienzo del proyecto.
- A mis hermanos José, Astrid y Sophie, por animarme siempre con sus ocurrencias.
- A mi abuelita Elvia Dolores, por ser un motor en mi corazón cada día con su hermosa sonrisa, por ser el aliento que necesitaba cada mañana para comenzar mis labores.
- A mi abuelito Luis Figueroa Q.E.P.D, porque desde el cielo me levantó y no permitió que nada ni nadie fuera un obstáculo imposible de superar durante la realización de este proyecto.
- A Marvin Ray, mi angelito incondicional que me ayudó a superar cada adversidad que se me presentó a lo largo de la realización del proyecto. Gracias a su paciencia, por ser la mejor compañía y el mejor amigo.
- A Jimmy y Víctor, quienes desde su liderazgo en la empresa me ayudaron con la concepción de la idea de este trabajo.
- A Boss y a Ebi, por permitirme entrar a su vida y hacerme ver la realidad de una manera hermosa, son mi tesoro.

RESUMEN

Actualmente los laboratorios de reproducción asistida cuentan con diversos análisis que ayudan a diagnosticar la infertilidad del paciente. El espermatograma es la evaluación de las características macroscópicas y microscópicas de las muestras seminales, no obstante, a partir de este análisis no se puede obtener una visión de la integridad del material genético del espermatozoide, siendo este un importante indicador de la fertilidad masculina.

Por el contrario, existe un análisis que evalúa la integridad del material genético del espermatozoide: test de fragmentación del ADN espermático. Es un examen que determina el porcentaje de roturas y daños que existe en el ADN, además de la severidad del deterioro. El daño al material genético es importante ya que está relacionado a abortos espontáneos, bajo porcentaje de fecundación y mala calidad embrionaria.

A lo largo de los años se ha estado estudiando la relación existente entre el índice de fragmentación del ADN espermático (IFA) con el espermatograma, habiendo controversia en los resultados. El presente estudio se basó en pacientes que residen en el Perú y que se han realizado estos análisis en una clínica de fertilidad donde se plantea encontrar la relación existente entre los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático, basándonos en los factores más influyentes que pueden alterar la calidad seminal, como por ejemplo el estrés, la contaminación ambiental, el trabajo sedentario, el consumo excesivo de sustancias dañinas para el organismo como el alcohol y el tabaco.

El estudio se realizó a partir de una base de datos, siendo las variables: la edad, los días de abstinencia sexual, el IFA del paciente y tres parámetros del espermatograma: motilidad, concentración y morfología espermática.

Como resultado, se obtuvo una correlación inversa y significativa entre el IFA y los parámetros seminales estudiados.

Palabras claves: Espermatoograma, Fragmentación del ADN, Motilidad Espermática, Concentración Espermática, Morfología espermática.

ABSTRACT

Currently, assisted reproduction laboratories have various tests that help diagnose infertility in the patient. The spermatogram is the evaluation of the macroscopic and microscopic characteristics of the seminal samples, however, from this analysis it is not possible to obtain a vision of the integrity of the genetic material of the sperm, this being an important indicator of male fertility.

On the contrary, there is an analysis that evaluates the integrity of the genetic material of the sperm: sperm DNA fragmentation test. It is an exam that determines the percentage of breaks and damage that exists in the DNA, as well as the severity of the deterioration. Damage to the genetic material is important since it is related to spontaneous abortions, low fertilization percentage and poor embryonic quality.

Over the years the relationship between the sperm DNA fragmentation index (IFA) and the spermatogram has been studied, with controversy regarding the results. The present study was based on patients who reside in Peru and who have carried out these analyzes in a fertility clinic where it is proposed to find the relationship between seminal parameters and sperm DNA fragmentation, based on the most influential factors that can alter seminal quality, such as stress, environmental pollution, sedentary work, excessive consumption of substances harmful to the body such as alcohol and tobacco.

The study was carried out from a database, the variables being: age, days of sexual abstinence, the patient's IFA and three parameters of the spermatogram: motility, concentration and sperm morphology.

As a result, an inverse and significant correlation was obtained between the IFA and the seminal parameters studied.

Key words: Spermatogram, DNA Fragmentation, Sperm Motility, Sperm Concentration, Sperm Morphology

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
1.1	PROBLEMA	1
1.2	JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	3
1.3	ANTECEDENTES	4
II	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GENERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
III	METODOLOGÍA	14
3.1	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	14
3.2	OBTENCIÓN DE MUESTRA Y ESPERMATOGRAMA.....	15
3.3	TEST DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	17
3.3.1	MAPA CONCEPTUAL DE LA TÉCNICA DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD)	20
3.4	DEFINICIÓN DE VARIABLES	21
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	23
3.6	ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN	26
IV	RESULTADOS.....	27
V	DISCUSIÓN	36

VI	CONCLUSIONES	40
VII	RECOMENDACIONES	41
VIII	BIBLIOGRAFÍA.....	42

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
OMS	Organización Mundial de la Salud
IFA	Índice de Fragmentación del ADN
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SCD	Dispersión de la Cromatina Espermática
TUNEL	Terminal dUTP Nick-End Labeling
ISNT	Traducción de Nick <i>in situ</i>
SCSA	Análisis de la Estructura de la Cromatina Espermática
DBD – FISH	Roturas del ADN-Hibridización Fluorescente <i>in situ</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análisis descriptivo según el tipo de variable a utilizar.

Figura 2. Prueba de Kolmogórov-Smirnov para determinar la distribución normal de las variables cuantitativas.

Figura 3. Análisis de correlación para determinar la asociación entre la fragmentación del ADN espermático y las variables estudiadas.

Figura 4. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y la edad de los pacientes estudiados.

Figura 5. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y los días de abstinencia sexual de los pacientes estudiados.

Figura 6. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y el porcentaje de espermatozoides inmóviles.

Figura 7. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal.

Figura 8. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y la concentración de espermatozoides por eyaculado.

Figura 9. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.

Figura 10. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal.

Figura 11. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y la concentración de espermatozoides por mililitro.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de referencia límites para las características seminales según el Manual de la Organización Mundial de la Salud - 2010.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de las técnicas para evaluar el daño en el ADN del espermatozoide humano.

Tabla 3. Descripción de las variables del estudio a realizar.

Tabla 4. Análisis descriptivo de parámetros seminales empleando media y desviación estándar (n = 333).

Tabla 5. Análisis de Kolmogórov-Smirnov para determinar la distribución normal de las variables estudiadas.

Tabla 6. Análisis de Mann-Whitney para distinguir las diferencias entre los pacientes con alto y bajo índice de fragmentación de ADN espermático IFA (*p< 0.05).

Tabla 7. Análisis de Chi-cuadrado entre el Índice de Fragmentación del ADN (Alta o Baja) con las variables del análisis seminal. Se evidencia la frecuencia observada y el porcentaje

I INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMA

El material genético del espermatozoide se encuentra fuertemente compactado en su cabeza y protegido, esto sucede gracias a enzimas específicas que son adquiridas en su maduración, sin embargo; cuando hay una mala compactación de esta, deja al material genético expuesto a radicales libres, nucleasas, mutágenos, etc. (Dos Santos et al., 2020) Al transcurrir el tiempo, se evidenció que el material genético también podría ser dañado o roto por razones que no solo incluían una mala compactación, sino también un deficiente desarrollo desde la formación del espermatozoide y factores ambientales. (Quintero et al., 2015). La importancia del estudio del material genético del espermatozoide es debido a su indudable impacto en el éxito reproductivo.

Las causas de la fragmentación del ADN son diversas, incluso hay causas hipotéticas. Se ha comprobado que la fragmentación de ADN espermático es un importante indicador de la fertilidad masculina (Sakkas et al., 1999) cuando se realizaron estudios en pacientes alrededor del mundo y se evidenció que existía una correlación significativa con la cantidad de ovocitos fecundados, el número de embriones de buena calidad y el porcentaje de abortos espontáneos. (Xue et al., 2016)

El ADN del espermatozoide tanto como su impacto en la fertilidad se ha venido estudiando desde más de veinte años (Rex et al., 2017). En la clínica de fertilidad además de evaluar el porcentaje de fragmentación de ADN que tiene una muestra seminal, también evaluamos otros indicadores de infertilidad detallados por la Organización Mundial de la Salud como parámetros seminales (OMS, 2021). Este examen a diferencia

del test de fragmentación de ADN, es un análisis de rutina que nos confirma la existencia de espermatozoides en la muestra eyaculada, la concentración, si estos se mueven, si están vivos, etc. No obstante, no indica la integridad del material genético. (Portella et al., 2016)

A pesar de las investigaciones sobre la fragmentación del ADN espermático sigue habiendo una gran controversia si este guarda relación con los parámetros seminales que se analiza rutinariamente en el laboratorio de andrología debido a los distintos resultados que se han venido obteniendo en el curso de los años. (Minh et al., 2019) En el presente estudio también se consideró el tiempo de abstinencia sexual que tuvo cada paciente previo a la emisión de la muestra seminal.

Las causas de la fragmentación del ADN además de lo ya descrito también están relacionado con edad, especies reactivas de oxígeno, tabaquismo y contaminación ambiental (Rubes et al., 2021), y su efecto varía dependiendo la población estudiada.

1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Por estas razones mencionadas, es importante realizar un estudio en la población peruana. Porque somos un país muy diverso, sujetos a una rutina de estrés, en una cotidiana congestión vehicular, con un estilo de vida diferente a otros países dónde se ha realizado este estudio y expuestos a distintas enfermedades, por ejemplo.

Previo al test de fragmentación de ADN y al análisis de los parámetros seminales, es importante indicar cuántos días de abstinencia sexual tiene el paciente ya que se ha demostrado que el incremento de días de abstinencia sexual en hombres afecta negativamente la calidad seminal, específicamente cambiando la estructura de su material genético, (Comar et al., 2017) es por esta razón que los días de abstinencia sexual será una de las variables del presente estudio que también es un dato fundamental previo al análisis de los parámetros seminales rutinariamente estudiados en los centros de fertilidad. (Hanson et al., 2018)

1.3 ANTECEDENTES

Se conoce como infertilidad a la incapacidad de concebir después de mantener relaciones sexuales en el periodo de 1 a 12 meses calendario. (Agarwal et al., 2015)

La infertilidad en el Perú no es tratada como una enfermedad cuando debería serlo. Las mujeres de nuestra sociedad moderna que buscan superarse, ponen como prioridad sus estudios y trabajos postergando la maternidad pensando equivocadamente que no habrá repercusiones a futuro, sin embargo, a medida que uno va envejeciendo, la reserva ovárica va disminuyendo y consigo también la producción de óvulos. (Ascenso, 2018)

Por otro lado, la fertilidad masculina también se está viendo gravemente afectada y la infertilidad va en aumento desde hace más de 40 años. Por consiguiente, la Organización Mundial de la Salud ha creado un manual para la examinación, preparación y control de calidad de la muestra seminal, en donde estandariza cada cierto tiempo los parámetros seminales según los estudios que se vayan realizando y verificando a medida del tiempo. (OMS, 2021)

Llamamos espermatogénesis a la etapa dónde se da la formación de espermatozoides en los testículos (Nussbaum et al., 2015), consiste de divisiones mitóticas y meióticas de la célula madre espermatogonia especializada hasta obtener un espermatozoide maduro con el citoplasma reducido. (Turek, 2021) Durante este proceso puede haber distintos factores intrínsecos y extrínsecos que afectan al espermatozoide, produciéndose la fragmentación de ADN, es decir un disturbio en la estructura sana del material genético del espermatozoide. (OMS, 2021) Para evaluar la proporción de espermatozoides con el material genético dañado en una muestra seminal se realiza un test que tiene diversas técnicas y formas de realizarse. Más adelante se explicará algunas importantes y el que se utilizará en el presente estudio.

Tabla 1.

Valores de referencia límites para las características seminales según el Manual de la Organización Mundial de la Salud - 2010.

Parámetro	Valor mínimo de referencia
pH	7.2
Volumen (<i>ml</i>)	1.5
Concentración espermática (10^6 por <i>ml</i>)	15
Concentración total (10^6 por eyaculado)	39
Motilidad progresiva (<i>PR</i> , %)	32
Motilidad total (<i>PR</i> + <i>NP</i> , %)	40
Vitalidad (<i>espermatozoides vivos</i> , %)	58
Morfología espermática (<i>normales</i> , %)	4

Fuente: Organización Mundial de la Salud

Los parámetros seminales se analizan mediante un examen seminal llamado espermatoograma. El espermatoograma es una evaluación diagnóstica de la infertilidad del hombre. Es el análisis macroscópico y microscópico del semen, donde los parámetros más importantes que se mide es volumen, pH, concentración, motilidad, vitalidad y morfología espermática (**Tabla 1**). En la actualidad, se ha comprobado que esta evaluación no es suficiente, por lo que también se le hacen preguntas personales al paciente. Estas preguntas incluyen si es que ha sufrido infecciones recientes, exposiciones a rayos X, etc. (Magalhães et al., 2021)

En el presente estudio se analizaron 3 parámetros importantes del espermatoograma: motilidad, concentración y morfología espermática. La concentración espermática en el eyaculado no solo es importante en los humanos, también en los animales ya que

representa el éxito reproductivo y también es considerado como predictor de concepción (OMS, 2021). Con el término “concentración espermática” nos referimos a la cantidad de espermatozoides que existe en el líquido seminal. Esta se obtiene mediante el conteo de un mínimo de 200 espermatozoides, así como la aplicación de una fórmula específica para definir el número de espermatozoides/ml. Actualmente el manual para la examinación y procesamiento del semen humano de la Organización Mundial de la Salud definió que el valor mínimo normal de concentración espermática en humanos es 15 millones de espermatozoides/ml, mientras que en el manual de la OMS de 1999 era 20 millones de espermatozoides/ml. Esto confirma que la infertilidad del ser humano va en aumento y que los estándares deben acomodarse a ello. No obstante, puede suceder que el ser humano tenga valores de concentración por debajo de 15 millones/ml, es decir fuera del rango normal, a esta condición se le llama oligozoospermia.

La oligozoospermia es una condición que se puede clasificar en leve cuando la concentración es de 11 a 14 millones de espermatozoides/ml. Es moderada cuando la concentración está en un rango de 6 a 10 millones de espermatozoides/ml, y finalmente es severa cuando la concentración espermática es muy deficiente y está entre 0.1 a 5 millones de espermatozoides/ml. (Choy et al., 2020)

También existe una alteración aún más grave que la oligozoospermia llamada criptozoospermia. Es una condición cuando la cantidad de espermatozoides es menor a 0.1 millones de espermatozoides/ml y las probabilidades de lograr un embarazo son muy bajas. Es una condición que en este estudio ningún paciente la padeció, sin embargo, es importante mencionar su existencia para que no sea confundida con azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado).

La motilidad se refiere a la movilidad espermática. Es una importante característica en el espermatozoide. Marca un importante hito en lo que concierne a fertilidad, con ayuda

de un solo flagelo, el espermatozoide necesita una buena energía para superar los obstáculos de la capacitación espermática que acontece en el cuello uterino en la vagina y así poder lograr la fecundación, esto es superar ambientes difíciles, necesita no solo que el flagelo se mueva rápido, sino también que se adapte a las condiciones donde se encuentre. (Freitas et al., 2017) En el análisis seminal se evalúa 3 tipos de motilidad: la motilidad progresiva, la motilidad no progresiva y la inmotilidad del espermatozoide.

La motilidad progresiva se refiere a los espermatozoides característicos de un movimiento que les permite avanzar. La motilidad no progresiva se refiere a los espermatozoides que tienen movilidad, sin embargo, carecen de un avance en su movimiento, por lo tanto, se mueven en su propio eje o en círculos. Los espermatozoides inmóviles son los espermatozoides que no se mueven, pero esto no significa que estén muertos. (Freitas et al., 2017).

El valor límite de referencia según la Organización Mundial de La Salud en el manual de examinación y procesamiento del semen humano de 1999 fue de 50% de espermatozoides móviles progresivos, mientras que en el manual del 2010 el valor límite se redujo a un 32%. (OMS, 2021) Esto coincide con los datos de concentración espermática, confirmándonos que la infertilidad en el hombre sigue aumentando alrededor del mundo.

Existe la condición, donde el hombre puede tener menos del 32% de espermatozoides móviles progresivos, a esta condición se le llama astenozoospermia. La astenozoospermia puede ser leve si la afección va de 22 a 31% de espermatozoides progresivos, puede ser moderada si el rango es entre 11 a 21% de espermatozoides progresivos, y severa, donde la motilidad progresiva puede ir de 0 a un 10%. (OMS, 2021)

La morfología del espermatozoide se refiere a la evaluación de la forma, tamaño en general de su cabeza, pieza intermedia y cola. Cada edición del manual de la Organización

Mundial de la Salud va incrementando su descripción de “anormalidades”. Es por esto que en la última edición se llegó un acuerdo que un espermatozoide normal debería tener una cabeza ovalada con un acrosoma, una pieza intermedia respetando el término de la cabeza y una cola sin gotas citoplasmáticas ni curvaturas fuera de lo normal. Se debe analizar 200 espermatozoides por muestra. El valor mínimo según el manual de la OMS actualmente es 4% de espermatozoides normales. Un valor inferior según estudios, tendría implicancias negativas en el embarazo. (Danis et al., 2019) La condición del hombre cuando tiene menos del 4% de espermatozoides normales se llama teratozoospermia.

La fragmentación del ADN se refiere a los daños o rupturas que puede existir en el material genético condensado situado en el núcleo de la cabeza del espermatozoide, debido a causas intrínsecas como por ejemplo defectos en la maduración espermática, estrés oxidativo, edad, alguna infección, trastornos hormonales. También se puede deber a factores ambientales como son la dieta, exposición a toxinas, exposición al calor, radiación, abuso de sustancias tóxicas. (Agarwal et al., 2020)

La fragmentación del material genético puede ser de distintos tipos: por pérdida de una base, bases desajustadas entre sí por no ser complementarias, dímeros de pirimidina, incluso el rompimiento de una hebra o ambas. (Agarwal et al., 2020) Este daño puede ser reparable dependiendo la magnitud, el grado de exposición a la toxina, y la capacidad de reparación del óvulo al momento que sucede la fecundación. (Sadeghi, 2021)

La gran mayoría de estudios publicados todavía genera mucha controversia. Uno de ellos es la relación que guarda los daños y rupturas en la estructura del ADN del espermatozoide con los parámetros seminales rutinariamente estudiados. Se ha mencionado que la fragmentación de ADN espermático es un importante indicador de la fertilidad masculina, como se ha comentado, guarda una relación significativa con

variables importantes como son la fecundación y abortos espontáneos. (Xue et al., 2016)

Una muestra seminal de buena calidad: buena concentración, buen movimiento progresivo del espermatozoide, buena forma de cabeza, pieza y cola, tiende a tener bajo porcentaje de daño en el ADN. (Alwan et al., 2020) Mientras otros estudios sugieren que esto no siempre se cumple, que un espermatozoide aparentemente normal, puede tener el material genético con daños internos leves o severos. (Guo et al., 2020) Lo más crítico de este último enunciado es que un espermatozoide con el material genético dañado/fragmentado aun así puede fecundar un óvulo, causando problemas gestacionales a futuro. (Minh et al., 2019)

Hace algunos años se publicó un importante estudio, donde concluían que la fragmentación del ADN espermático y los parámetros seminales estaban inversamente relacionados y que implementar el test de fragmentación de ADN espermático en los laboratorios de reproducción asistida es de vital importancia. (Ganzer et al., 2017)

Para el análisis del test de fragmentación de ADN espermático existe varias técnicas (Javed et al., 2019) una de las más utilizadas es la técnica TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling).

El TUNEL es una técnica sensible que mide la fragmentación de ADN ubicando las zonas donde hay roturas del ADN ya sea en la cadena simple o doble mediante un indicador fluorescente (Quintero et al., 2015). Esta técnica a pesar de ser muy utilizada en grandes laboratorios, no es un examen que en realidad se pueda aplicar en muchos centros en Perú dado a su alto costo. También se evaluó la concentración y motilidad mediante un sistema de analizador de espermatozoides automático. El fin de estos sistemas computarizados, es disminuir el margen de error en el conteo de espermatozoides móviles porque podría haber confusión en el conteo con los espermatozoides inmóviles o con algunas células sueltas. (OMS, 2021)

Actualmente en los centros de fertilidad en el Perú, para realizar conteo de espermatozoides, así como su movilidad, lo realizamos mediante el microscopio óptico. Esto no tendría que ocasionar grandes errores si los miembros del equipo del laboratorio de andrología cuentan con la experiencia suficiente, además si estos están siendo constantemente evaluados para no perder el estándar del trabajo. Al seguir capacitando personal para realizar estos análisis, no solo estamos mejorando nuestras técnicas, al realizarlo de manera manual, seguimos manteniendo el costo de nuestros análisis.

Otro estudio, concluyó que no se encontró una correlación tan importante ni significativa entre la fragmentación del ADN espermático y los parámetros seminales. (Minh et al., 2019)

Como se detalló, existen varias técnicas para medir el daño en el material genético del espermatozoide, cada una con sus ventajas y desventajas (**Tabla 2**). Para el presente estudio necesitamos utilizar una técnica que se adecúe al paciente. La técnica TUNEL al ser una técnica costosa, el acceso a ella es limitado; no es directa y hay pruebas que son más rápidas, de bajo costo y además brinda la facilidad de realizar el test a varias muestras seminales al mismo tiempo, acortando el tiempo que el biólogo invierte en el análisis, sin alterar los resultados. La técnica más utilizada alrededor del mundo y de la que podemos obtener estas ventajas es llamada la técnica de dispersión por cromatina espermática (SCD). Consta de varios procesos al que se le somete el material genético, entre ellos procesos de desnaturalización del ADN para tener mejor acceso al material genético, y el proceso de lisis para la extracción de sus proteínas nucleares. Finalmente, si el espermatozoide tiene el ADN íntegro se observa un halo alrededor de la cabeza del espermatozoide, que viene a ser la cromatina expandida. Si el ADN presenta el halo muy pequeño, el ADN se encuentra fragmentado. (Gosálvez et al., 2011) El procedimiento será explicado detalladamente en METODOLOGÍA.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de las técnicas para evaluar el daño en el ADN del espermatozoide humano.

TEST	EQUIPAMIENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
TUNEL	Microscopio de fluorescencia Citometría de flujo	Realiza parámetros de control de calidad Detecta daño de una o dos hebras.	Equipo de alto costo Requiere estandarización Consume tiempo
ISNT	Microscopio de fluorescencia Citometría de flujo	Marcaje directo Baja variabilidad entre observadores	Equipo de alto costo
SCSA	Citometría de flujo	Punto de corte: 30% que diferencia los fértiles de los infértiles	Equipo de alto costo Requiere técnicos altamente calificados
SCD	Microscopio de campo claro Microscopio de fluorescencia	Tecnología sencilla Económico Disponibilidad del Kit comercial	Evaluación microscópica intensa Subjetividad Consume tiempo
COMETA	Microscopio de fluorescencia Electroforesis de ADN	Bajo costo Detecta varios tipos de daño en el ADN	Ejecución tardía Requiere cierta experiencia
DBD - FISH	Microscopio de fluorescencia	Se puede analizar todo el ADN o alguna secuencia específica de interés	Procedimiento complejo Procedimiento de alto costo Consume tiempo

Fuente: Adaptación con algunas modificaciones del cuadro original de Cortés et al., 2007.

TUNEL: terminal dUTP Nick-End Labeling; ISNT: Traducción de Nick *in situ*; SCSA: análisis de la estructura de la cromatina espermática; SCD: dispersión de la cromatina espermática; DBD-FISH: roturas del ADN-hibridización fluorescente *in situ*.

II OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación existente entre el índice de fragmentación del ADN espermático con los parámetros seminales rutinariamente estudiados en pacientes con problemas de fertilidad que residen en el Perú.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la relación entre el índice de fragmentación del ADN espermático con la morfología espermática.
- Determinar la relación entre el índice de fragmentación del ADN espermático con la concentración espermática.
- Determinar la relación entre el índice de fragmentación del ADN espermático con la motilidad espermática.

III METODOLOGÍA

3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio se justifica en el análisis de base de datos donde fueron incluidos 333 hombres adultos entre la edad de 23 a 71 años que han asistido a una clínica de fertilidad situada en el distrito de San Isidro en Lima Metropolitana - Lima, Perú; con el fin de realizarse un espermatograma para el análisis de sus parámetros seminales y el test de fragmentación de ADN espermático entre enero 2017 y agosto 2021. En la **Tabla 7** se evaluó una población de n=333 (edad, concentración y motilidad), excepto en morfología que se evaluó n=332 ya que hubo un paciente al que no se encontró registro de los datos de morfología espermática en la base de datos Microsoft Excel, sin embargo, se encontró registro de todos los demás parámetros, incluyendo fragmentación del ADN espermático.

Los pacientes azoospermicos fueron excluidos del estudio, es decir, los que presentan una condición cuando en el eyaculado no se observa espermatozoides, también se excluyeron pacientes que presentaban fiebre o malestar general en el momento de la emisión de la muestra o días previos. Se incluyeron pacientes con infertilidad, a los que se les detectó alguna infección meses previos, a los que solo pasaron consulta y a los que fueron diagnosticados previamente con alguna enfermedad crónica como el cáncer.

3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRA Y ESPERMATOGRAMA

Para determinar los parámetros seminales, tuvimos como referencia el “Manual para la examinación y el procesamiento del semen humano” de la Organización Mundial de la Salud. El paciente realizó la emisión de muestra en un ambiente con las comodidades respectivas, se le brindó un frasco estéril de boca ancha donde rotuló su nombre completo y fecha. Previo al examen del espermatograma, los pacientes tuvieron un tiempo de abstinencia sexual entre 2 a 5 días por relaciones sexuales o masturbación.

Una vez emitida la muestra, esta se dejó reposando a temperatura ambiente de 15 a 30 minutos; tiempo necesario para que las enzimas de la secreción prostática actúen sobre la muestra seminal coagulada, haciendo que el semen adquiriera un aspecto más líquido. (Proceso de licuefacción) (Lilja et al., 1984)

Luego de 30 minutos, el grado de alcalinidad fue calculado utilizando una tira indicadora de pH. El volumen, viscosidad y homogeneidad de la muestra fueron evaluados utilizando una pipeta volumétrica estéril de plástico de 3ml. Se colocó 10 uL de muestra con una micropipeta sobre una lámina porta objetos y para observarla en el microscopio óptico binocular Greetmed, se colocó una lámina cubre objetos.

La motilidad espermática se realiza mediante la contabilidad de espermatozoides progresivos, no progresivos e inmóviles. Su observación es a 40x. La concentración espermática fue calculada utilizando una cámara de Neubauer. La vitalidad espermática fue obtenida mediante la visualización de 5 uL de muestra seminal nativa homogenizada con 5 uL de eosina diluida con agua destilada. La morfología espermática se realizó colocando 10 uL de muestra en un extremo de la lámina porta objetos, en un ángulo de 45° se barrió lentamente la muestra con otra lamina porta objetos para dar como resultado el frotis. Se dejó secar.

Una vez seca toda la lámina, se cubrió todo con etanol de 96° durante 2 minutos. Una vez cumplido esos minutos desechamos el exceso y esperamos que seque el sobrante de la laminilla. Cuando secado se haya completado en su totalidad, con una pipeta volumétrica de 3ml se colocó el diluyente de eosina con agua destilada por todo el frotis durante 8 minutos; cumplido el tiempo, se desechó el exceso para colocar la tinción Wright durante otros 8 minutos. Se esperó que se cumpla el tiempo para desechar el exceso y esta vez enjuagamos con agua destilada. Dejamos secar. Se observó en el microscopio óptico binocular Greetmed a 100x con ayuda del aceite de inmersión (OMS, 2021).

3.3 TEST DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

A los pacientes que se les realizaron este análisis, tuvieron entre 2 a 5 días de abstinencia sexual por relaciones sexuales o masturbación. La muestra se colectó en un frasco estéril de boca ancha, se le indicó al paciente que, al momento de coleccionar la muestra, esta debe estar completa sin fracciones perdidas. Se puede realizar el test ese mismo día o también se puede guardar a una temperatura de -20°C por los siguientes días.

El test de fragmentación de ADN espermático fue realizado por distintos biólogos al pasar de los años mediante la técnica de la dispersión por cromática espermática (SCD). Se utilizó el Kit SpermFunc® (Bred Life Science Technology, Inc, Shenzhen, China). El kit se mantuvo a una temperatura alrededor de 2 a 8°C para evitar su rápido vencimiento. Todos los implementos del kit deben ubicarse refrigerados y solo deben emplearse al momento de realizar el test, además las láminas del kit son sensibles a la humedad del ambiente.

Se realiza el test a partir de la muestra nativa, sin preparaciones anticipadas. Primero se realizó la concentración espermática (ESPERMATOGRAMA, OMS), se diluyó la muestra en caso se tuvo una concentración considerablemente alta de espermatozoides (más de 10 millones por mililitro) esto se realizó con el fin de obtener una mejor visualización de los halos posteriormente a la tinción de la muestra.

La dilución se realizó utilizando el buffer Wright. La muestra diluida fue mezclada con agarosa derretida, la agarosa proporciona un área para poder fijar los espermatozoides. (Fernández et al., 2018)

La muestra con la agarosa fue homogenizada y pipeteada a una lámina porta objetos y cubierta con una 22 x 22mm lámina cubre objetos.

Los siguientes pasos a seguir son los recomendados por el protocolo de SpermFunc® y los que sugiere la Organización Mundial de la Salud, adecuados para el procesamiento de muestras en el IMR-CRP.

La lámina fue colocada en reposo durante 10 minutos en una temperatura de 4°C aproximadamente, en este caso lo dejamos en la parte baja de la refrigeradora. Esto se realizó con el fin de que la agarosa se establezca en la lámina y pueda tolerar los próximos pasos. Una vez cumplido el tiempo, se colocó la lámina porta objetos nuevamente a temperatura ambiente y se deslizó suavemente la lámina cubre objeto a un lado, sin dañar la agarosa.

Posteriormente, se colocó 300 uL de “Solución A” que viene a ser la solución ácida, durante 7 minutos. La solución ácida es una solución no tan agresiva cuya función es desnaturar el material genético del espermatozoide. Sus “puntos de comienzo” son las pequeñas roturas en el ADN, y así va desnaturando todas las hélices; en este paso, los espermatozoides con el ADN sin fragmentación quedan íntegros, aunque la solución ácida también los puede afectar, es por esto que llevar un tiempo adecuado es importante. (Fernández et al., 2018) Una vez cumplido el tiempo de la “Solución A”, se retiró el exceso y se colocó la “Solución B”. La solución B es la solución de lisis, encargada de la extracción de proteínas nucleares y protaminas del espermatozoide. Se colocó 300uL durante 25 minutos. Las protaminas son proteínas muy pequeñas encargadas del empaquetamiento del ADN en el núcleo del espermatozoide maduro. (Roque et al., 2011)

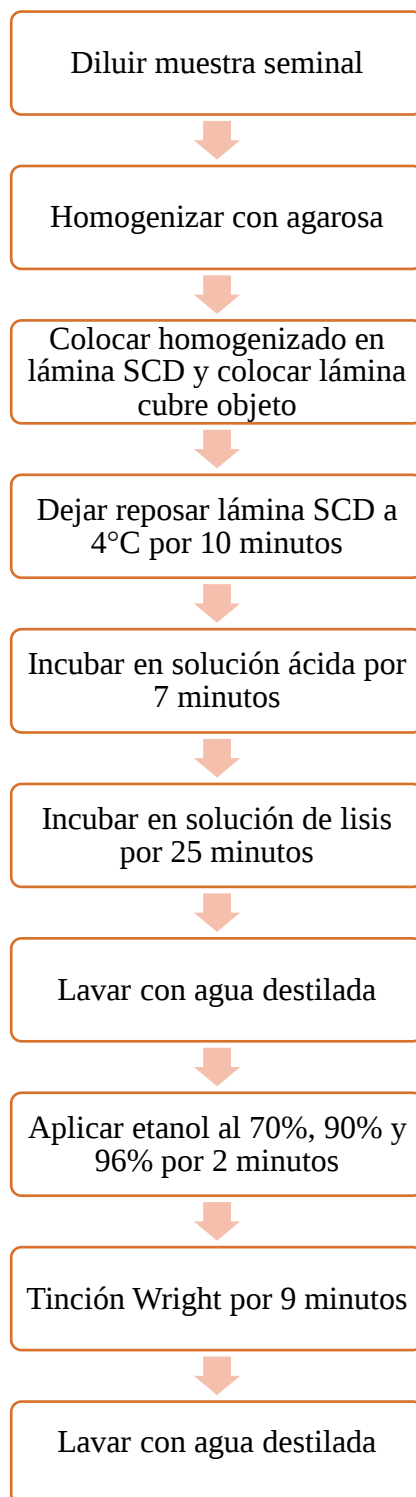
Hasta este punto, los espermatozoides que presentan protaminas (los que tienen el ADN íntegro), en este procedimiento de lisis van a sufrir la extracción de estas, los bucles de ADN se relajan, experimentando la formación de halos alrededor del núcleo del espermatozoide. Sin embargo, los espermatozoides con el ADN fragmentado que han

sido desnaturalizados en el paso anterior, no presentan compactación ni protaminas, por lo que dependiendo del daño en el ADN sus halos pueden ser pequeños o nulos.

Luego de estos importantes pasos, se lavó la lámina porta objetos cuidadosamente con agua destilada durante unos segundos. En seguida, se deshidrató la muestra en concentraciones crecientes de etanol (70°, 90° y 96°). Cada uno durante 2 minutos, sin lavar.

Finalmente, como último paso, para la observación de los halos se añadió 300 uL del colorante Wright durante 9 minutos. Cumplido el tiempo, se desechó el colorante, se lavó con agua destilada y se dejó secar. La observación se realizó mediante el microscopio óptico binocular Greetmed a 40x y se contaron 500 espermatozoides con halo o sin halo (o muy pequeño), el resultado que se colocó en el examen de fragmentación de ADN fue el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado que se estimaba de la muestra.

3.3.1 MAPA CONCEPTUAL DE LA TÉCNICA DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD)



Fuente: METODOLOGÍA

3.4 DEFINICIÓN DE VARIABLES

Tabla 3. Descripción de las variables del estudio a realizar.

VARIABLE	TIPO	DESCRIPCIÓN	UNIDAD DE MEDIDA
Edad	Variable cuantitativa continua	Especifica la edad del paciente estudiado.	Años.
Tiempo de abstinencia sexual	Variable cuantitativa continua	Tiempo en el que los pacientes se abstienen de mantener relaciones sexuales o realizar acto de masturbación.	Días.
Concentración	Variable cuantitativa continua	Evalúa el número de espermatozoides.	Millones/ml. Recuento mínimo de 200 espermatozoides analizados.
Motilidad	Variable cuantitativa continua	Evalúa el movimiento espermático.	Porcentaje (%). Se analizan 200 espermatozoides.
Morfología	Variable cuantitativa continua	Evalúa las anomalías morfológicas del espermatozoide en la cabeza, cuello y cola.	Porcentaje (%). Se analizan 100 espermatozoides.
Fragmentación del ADN	Variable cuantitativa continua	Evalúa la integridad del material genético del espermatozoide.	Porcentaje (%). Se analizan 500 espermatozoides.

VARIABLE	TIPO	DESCRIPCIÓN	UNIDAD DE MEDIDA
Oligozoospermia	Variable cualitativa ordinal	Alteración que causa disminución en la cantidad de espermatozoides. Puede ser leve, moderada o severa.	Millones/ml. Recuento mínimo de 200 espermatozoides analizados.
Astenozoospermia	Variable cualitativa ordinal	Alteración que causa disminución de número de espermatozoides móviles. Puede ser leve, moderada o severa.	Porcentaje (%) de espermatozoides progresivos móviles. Se analizan 200 espermatozoides.
Teratozoospermia	Variable cualitativa ordinal	Alteración que causa aumento de espermatozoides con morfología anormal. Puede ser leve, moderada o severa.	Porcentaje (%) de espermatozoides normales. Se analizan 100 espermatozoides.

Fuente: Tabla de elaboración propia con datos extraídos de la bibliografía.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos de los pacientes fueron exportados desde una base de datos en Microsoft® Excel® para ser analizados estadísticamente en el programa STATA versión 12.

En el análisis descriptivo y presentación de datos se aplicó la media y desviación estándar para las variables cuantitativas, mientras que la frecuencia y el porcentaje se aplicó a las variables cualitativas. Las variables cuantitativas concentración, motilidad y morfología fueron categorizadas según los parámetros establecidos por la OMS (oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia y normal). (OMS, 2021) En lo que respecta a la edad, fue categorizada en rangos de 10. (Pino et al., 2020)

Antes de realizar el análisis inferencial se realizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov para determinar la distribución normal de las variables. Se determinó que las variables estudiadas no seguían una distribución normal, por ello se realizó la prueba de Mann-Whitney. Con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney se va a determinar la significancia estadística entre dos muestras independientes. (Eddington, 2015)

Para la comparación de variables cualitativas se realizó la prueba de chi cuadrado.

Para determinar la asociación entre la fragmentación del ADN espermático y las variables estudiadas se determinó por medio del análisis de correlación Spearman.

La significancia estadística se determinó con valores de $p < 0.05$.

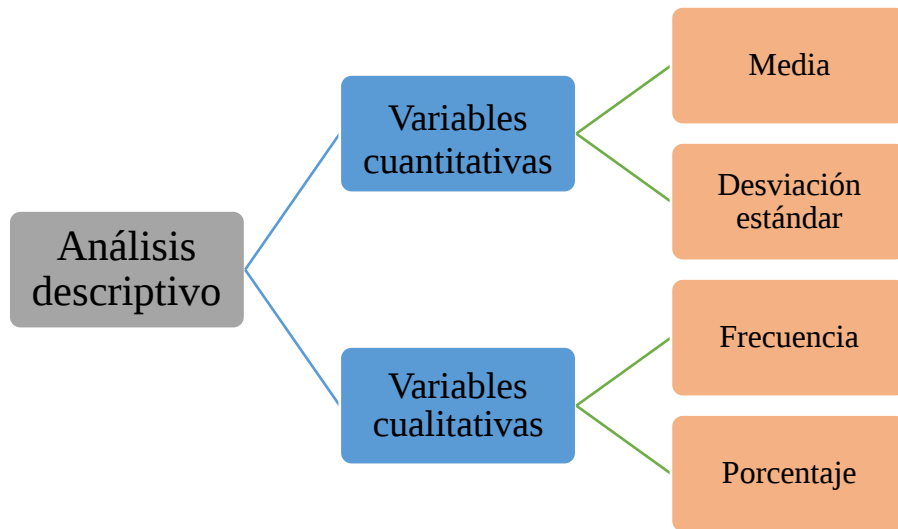


Figura 1. Análisis descriptivo según el tipo de variable a utilizar.

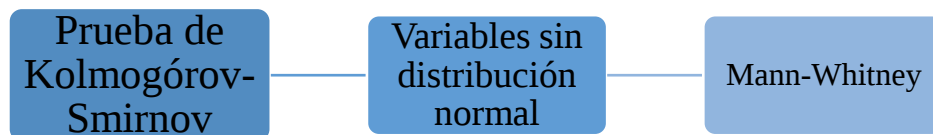


Figura 2. Prueba de Kolmogórov-Smirnov para determinar la distribución normal de las variables cuantitativas.

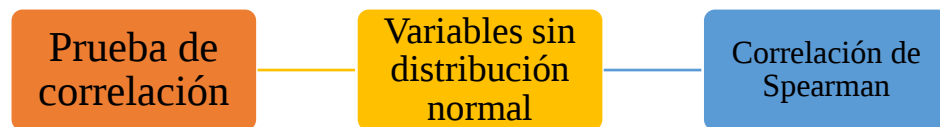


Figura 3. Análisis de correlación para determinar la asociación entre la fragmentación del ADN espermático y las variables estudiadas.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN

1. Para la realización e investigación de este estudio, se respetó la privacidad de los pacientes, codificando sus nombres y apellidos con el fin de que su perfil se mantuviera en total anonimato.
2. Se contó con la aprobación del centro de fertilidad para la utilización de los datos y su empleabilidad en el presente trabajo de suficiencia profesional.

IV RESULTADOS

El presente estudio se basó en el análisis de una base de datos conteniendo 333 datos de pacientes a los cuales se les realizó un análisis de espermatograma y a su vez un análisis de fragmentación de ADN espermático. La edad promedio fue de 40.6 ± 0.4 años (mínimo: 23 años y máximo 71 años). En la **Tabla 4**, estamos situados frente a un análisis descriptivo de las evaluaciones cuantitativas. El promedio de los días de abstinencia sexual contabilizando toda la población estudiada es de 3.7 días.

Además, el promedio de la concentración espermática de todos los pacientes del presente estudio tiene un valor de 54.5 millones de espermatozoides/ml. También el promedio de la motilidad espermática progresiva de la población estudiada es 36.1%. Con respecto a la morfología espermática, el promedio de pacientes tiene un valor de 7.3% de espermatozoides normales y un valor de 92.7% de espermatozoides anormales. También se calculó el promedio de los datos del índice de fragmentación del ADN espermático (IFA), resultando este de 22.1%.

En la **Tabla 5** se realizó el análisis de Kolmogórov-Smirnov para determinar si las variables cuantitativas ya descritas seguían una distribución normal.

Los resultados estadísticos indican que todas las variables no siguieron una distribución normal.

Tabla 4. Análisis descriptivo de las variables cuantitativas empleando media y desviación estándar (n = 333).

Variable	Valor mín.	Valor máx.	Media $\pm$ SD	Valor de referencia OMS
Edad (años)	23.00	71.00	40.6 $\pm$ 0.40	--
Tiempo de abstinencia sexual (días)	0.00	35.00	3.70 $\pm$ 2.50	--
Concentración espermática				
Millones/mL	0.50	524.00	54.50 $\pm$ 63.70	15.00
Millones/eyaculado	0.75	914.00	123.60 $\pm$ 136.50	39.00
Motilidad espermática (%)				
Progresivo	0.00	72.00	36.10 $\pm$ 15.20	32.00
No progresivo	0.00	38.00	12.20 $\pm$ 4.80	--
Inmóviles	15.00	100.00	51.50 $\pm$ 16.90	--
Morfología espermática (%)				
Normal	1.00	16.00	7.30 $\pm$ 2.70	4.00
Anormal	84.00	99.00	92.7 $\pm$ 2.70	--
IFA (%)	7.40	61.80	22.10 $\pm$ 7.60	--

Tabla 5. Análisis de Kolmogórov-Smirnov para determinar la distribución normal de las variables estudiadas.

Variable	Valor <i>p</i>
Edad (años)	$p < 0.05$
Tiempo de abstinencia sexual (días)	$p < 0.05$
Concentración espermática	
Millones/mL	$p < 0.05$
Millones/eyaculado	$p < 0.05$
Motilidad espermática (%)	
Progresivo	$p < 0.05$
No progresivo	$p < 0.05$
Inmóviles	$p < 0.05$
Morfología espermática (%)	
Normal	$p < 0.05$
Anormal	$p < 0.05$
IFA (%)	$p < 0.05$

Tabla 6. Análisis de Mann-Whitney para distinguir las diferencias entre los pacientes con alto y bajo índice de fragmentación de ADN espermático IFA (*p< 0.05). IFA Bajo: < 27% fragmentados. IFA Alto: >=27% fragmentados.

Variable	IFA %	
	Bajo (Media ± DS) n = 269	Alto (Media ± DS) n = 64
Edad (años)	39.80 ± 6.70*	43.80 ± 8.40
Tiempo de abstinencia sexual (días)	3.50 ± 1.60*	4.70 ± 4.70
Concentración espermática		
Millones/mL	55.70 ± 62.90	49.60 ± 67.20
Millones/eyaculado	131.90 ± 144.30*	88.50 ± 90.20
Motilidad espermática (%)		
Progresivo	37.80 ± 14.60*	28.90 ± 15.70
No progresivo	12.50 ± 4.70*	10.70 ± 4.60
Inmóviles	49.40 ± 16.10*	60.40 ± 17.90
Morfología espermática (%)		
Normal	7.60 ± 2.60*	6.30 ± 2.60
Anormal	92.40 ± 2.60*	93.70 ± 2.60

*p<0.05, estadísticamente significativo.

En la **Tabla 6** se observa una comparación entre cada uno de los parámetros seminales estudiados incluyendo edad y días de abstinencia sexual con el IFA según sea alto o bajo. Los resultados indican que aquellas personas con mayor IFA, tuvieron un considerable incremento de edad, mayor número de días de abstinencia sexual, un crecimiento en el porcentaje de espermatozoides inmóviles y un mayor porcentaje de espermatozoides anormales. Las personas con menor IFA tuvieron un mayor valor en la concentración espermática por eyaculado, superior porcentaje de motilidad espermática progresiva y un aumento en el porcentaje de espermatozoides normales.

Tabla 7. Análisis de Chi-cuadrado entre el Índice de Fragmentación del ADN (Alta o Baja) con las variables del análisis seminal. Se evidencia la frecuencia observada y el porcentaje.

Variable	IFA %		Chi - Cuadrado Valor p
	Bajo	Alto	
Edad (años)	<u>n: 269</u>	<u>n: 64</u>	
< 30 años	18 (6.7%) 16.2*	2 (3.1%) 3.8*	16.940, $p = 0.001$
31 a 40 años	134(49.8%) 128.4*	25(39.1%) 30.6*	
41 a 50 años	101(37.5%) 100.2*	23(35.9%) 23.8*	
> 50 años	16 (5.9%) 24.2*	14(21.9%) 5.8*	
Concentración espermática	<u>n: 269</u>	<u>n: 64</u>	
Oligozoospermia leve	8 (3.0%) 8.1*	2 (3.1%) 1.9*	6.522, $p = 0.089$
Oligozoospermia moderada	10 (3.7%) 12.9*	6 (9.4%) 3.1*	
Oligozoospermia severa	9 (3.3%) 11.3*	5 (7.8%) 2.7*	
Normal	242(90.0%) 236.7*	51(79.7%) 56.3*	
Motilidad espermática	<u>n: 269</u>	<u>n: 64</u>	
Astenozoospermia leve	43 (16.0%) 47.7*	16 (25.0%) 11.3*	20.299, $p < 0.000$
Astenozoospermia moderada	27 (10.0%) 27.5*	7 (10.9%) 6.5*	
Astenozoospermia severa	13 (4.8%) 20.2*	12 (18.8%) 4.8*	
Normal	186(69.1%) 173.7*	29 (45.3%) 41.3*	
Morfología espermática	<u>n: 268</u>	<u>n: 64</u>	
Teratozoospermia	19 (7.1%) 21.8*	8 (12.5%) 5.2*	2.024,

Normal	249(92.9%)	56(87.5%)	$p = 0.199$
	246.2*	58.8*	

*Representa el valor esperado

Para determinar la relación del IFA y las variables de interés de manera cualitativa se utilizó la prueba del chi cuadrado (**Tabla 7**). Se categorizó la edad entre cuatro grupos: hombres menores de 30 años, los de 31 a 40, de 41 a 50 y mayores de 50 años (Pino et al., 2020). Los resultados señalan una relación significativa entre el IFA y la edad de los pacientes estudiados. Con respecto a la relación con las variables del análisis seminal solo se encontró significancia entre la motilidad espermática (Chi-cuadrado= 20.299; $p<0.000$).

Las siguientes figuras muestran los resultados del análisis de correlación de Spearman que se aplica para variables que no siguen una distribución normal. En la **Figura 4** se observa una correlación directa y significativa entre el IFA y la edad de los pacientes ($r: 0.301$; $p<0.0001$). En la **Figura 5** se observa una correlación directa y significativa entre el IFA y los días de abstinencia sexual de los pacientes estudiados ($r: 0.158$; $p<0.004$). En la **Figura 6** se obtuvo una correlación directa y significativa entre el IFA y el porcentaje de espermatozoides inmóviles ($r: 0.272$; $p<0.0001$). En la **Figura 7** se observa una correlación directa y significativa entre el IFA y el porcentaje de espermatozoides anormales estudiados ($r: 0.196$; $p<0.0001$). En la **Figura 8** se observa una correlación inversa y significativa entre el IFA y la concentración espermática por eyaculado ($r: -0.141$; $p<0.010$). En la **Figura 9** se observa una correlación inversa y significativa entre el IFA y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (espermatozoides con capacidad de avanzar) ($r: -0.281$; $p<0.0001$). En la **Figura 10** se observa una correlación inversa y significativa entre el IFA y el porcentaje de espermatozoides con morfología

normal ($r: -0.206$; $p < 0.0001$). Finalmente, en la **Figura 11** se observa una correlación inversa y significativa entre el IFA y la concentración espermática por mililitro ($r: -0.114$; $p < 0.037$).

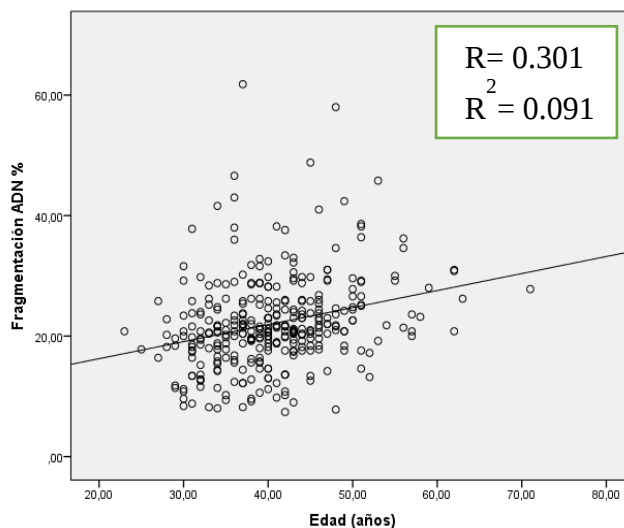


Figura 4. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y la edad de los pacientes estudiados.

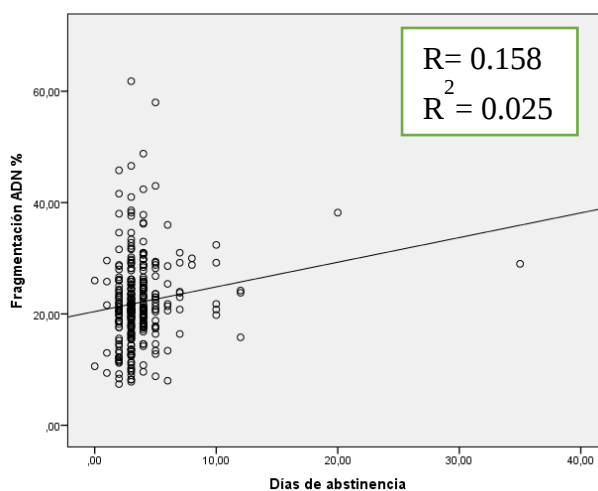


Figura 5. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y los días de abstinencia sexual de los pacientes estudiados.

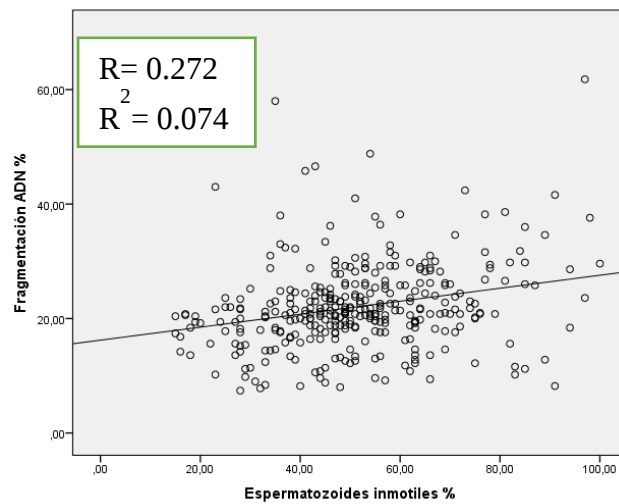


Figura 6. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y el porcentaje de espermatozoides inmóviles.

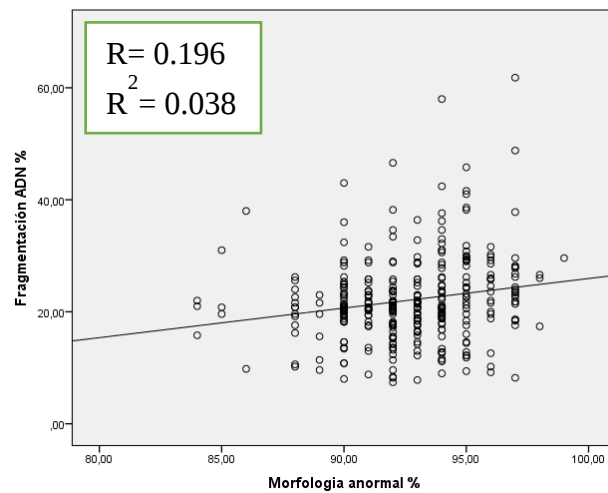


Figura 7. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal.

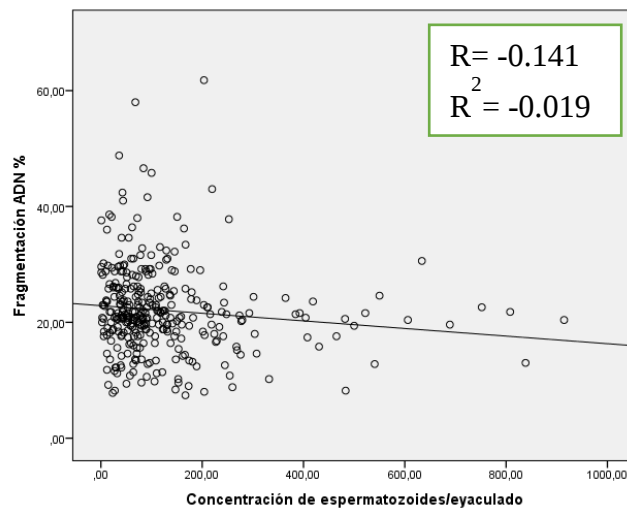


Figura 8. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y la concentración de espermatozoides por eyaculado.

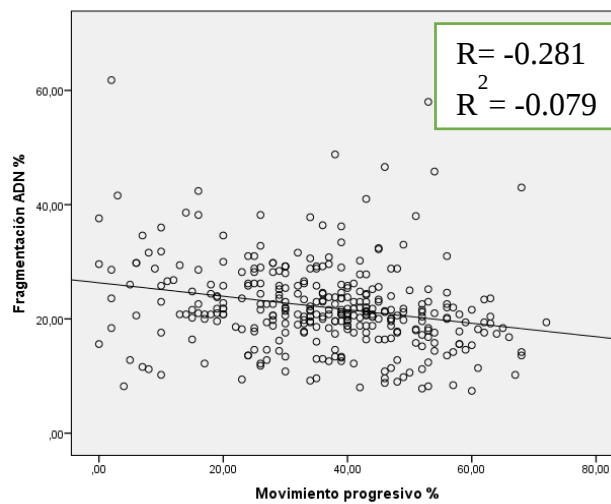


Figura 9. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.

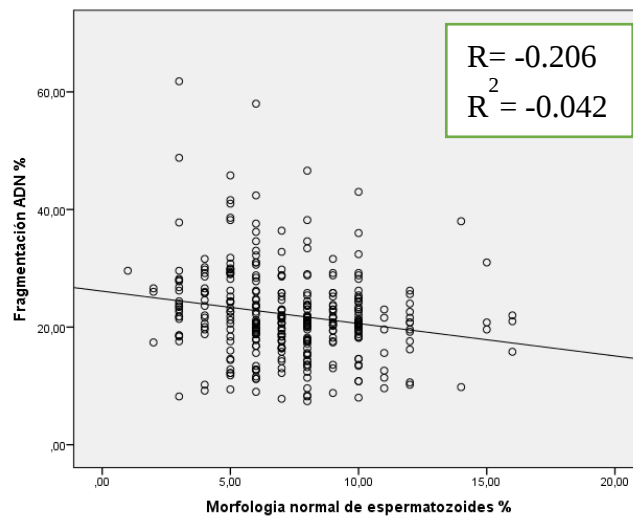


Figura 10. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal.

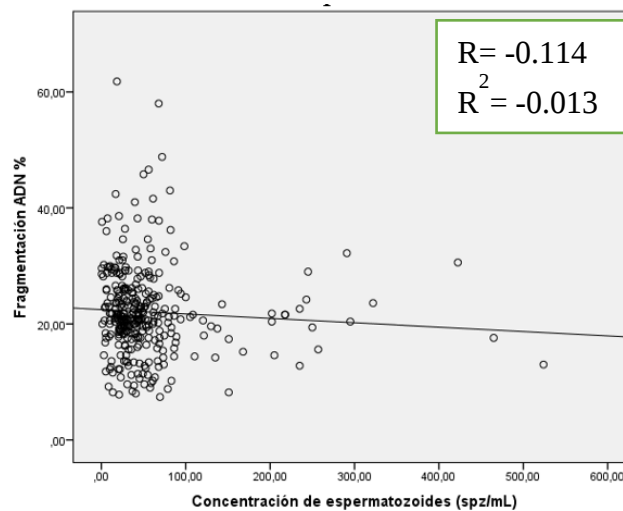


Figura 11. Análisis de correlación de Spearman entre el Índice de fragmentación del ADN y la concentración de espermatozoides por mililitro.

V DISCUSIÓN

El espermatoograma ha sido utilizado durante años como el principal análisis para determinar severidad de la calidad seminal del hombre, habiendo mejoras y estandarizaciones para el correcto trabajo entre laboratorios. Sin embargo, su falta de predicción sobre la fertilidad masculina de este análisis, nos hace buscar otras alternativas, en este caso, el test de fragmentación del ADN espermático. (Portella et al., 2016)

Se ha comprobado que el material genético es de alta relevancia en el momento de realizar los procedimientos de reproducción asistida. Ha habido estudios que relacionan el test de fragmentación de ADN con los parámetros seminales y otros que no. (Alwan et al., 2020) No obstante, en el presente estudio realizado en una población peruana, se encontró que hay una correlación significativa con los parámetros más importantes del espermatoograma.

Actualmente las causas de la infertilidad de las que se tiene conocimiento son limitadas, el presente estudio es de interés ya que al hallar una correlación entre los parámetros seminales con el test de fragmentación del ADN espermático, se tendría conocimiento de otra causa directamente relacionada con el factor masculino. (Pino et al., 2020)

El test de fragmentación de ADN se debe implementar previo a los procedimientos de baja y alta complejidad. En la clínica de fertilidad nosotros basamos el punto de corte de 27% como el valor máximo de espermatozoides fragmentados que debe haber en una muestra seminal, ya que se ha demostrado en 17 estudios con 2109 pacientes, que un valor por encima de este, afecta negativamente el embarazo y el tratamiento de reproducción asistida. (Evenson et al., 2006)

En la **Tabla 4** se observa que los pacientes estudiados tuvieron una edad mínima de 23 y un valor de edad máxima de 71 años, algunos estudios suelen excluir los pacientes de mucha edad para que no afecte el resultado del estudio, sin embargo, es importante recalcarlo para las posteriores investigaciones que se deben realizar a futuro. Se indagó el porcentaje de pacientes que eran adultos mayores, el resultado fue del 1.5%. Se consideró adulto mayor a todo paciente mayor de 60 años. (OMS, 2021)

Debido al amplio rango de edad que se analizó, se agrupó por edades: menores de 30 años, los que tienen entre 31 a 40, 41 a 50 y de 50 años a más. (Pino et al., 2020) Esto se realizó con el fin de poder analizar mejor la relación de cada grupo de edad con el IFA.

En la **Tabla 6** donde se realizó la prueba de Mann-Whitney para variables cuantitativas que no siguen una distribución normal, se confirmó la relación de las variables de interés con el IFA según sea alto o bajo. Se encontró una significancia en concentración, motilidad progresiva y morfología espermática, se corrobora con una destacada investigación donde también se encontró un valor significativo en concentración espermática con respecto al IFA alto o bajo. (Evgeni et al, 2015)

En los resultados se observa una correlación directa y significativa entre el IFA y la edad de los pacientes estudiados, aunque no es parte de los objetivos del presente estudio, esto puede deberse principalmente a la concentración de ROS acumulado que llega a formarse en estrés oxidativo por un desbalance con la cantidad normal de antioxidantes que necesita el organismo (volviéndose nocivo y afectando el material genético) (Petersen et al., 2018), también puede deberse a un daño mitocondrial, e incluso a la reducción de la madurez de la cromatina; no obstante, se requieren más estudios sobre esta relación. (Rosiak-Gill et al., 2019)

En la **Figura 5** se observa la correlación positiva y significativa de los días de abstinencia sexual con el IFA. Este resultado concuerda con otro en el que su estudio se basó en el

IFA con la abstinencia eyaculatoria, de manera que se concluyó que se obtiene una menor fragmentación del ADN espermático cuando los pacientes presentaban menos días de abstinencia sexual. (Agarwal et al., 2016)

Se encontró una correlación inversa y significativa entre el IFA y la motilidad, concentración y morfología espermática (**Figuras 6-11**). Estos resultados coinciden con una investigación donde también se obtuvo una correlación similar del IFA con la motilidad progresiva, la concentración espermática y la morfología normal de espermatozoides. (Evgeni et al, 2015)

Existen varios métodos y técnicas para medir el daño o fragmentación del material genético del espermatozoide humano. La técnica más utilizada por los centros de reproducción asistida en la actualidad es la técnica por dispersión de la cromatina espermática (SCD) ya que los reactivos los venden de forma comercial listos para su utilización, la metodología no es complicada y se puede emplear un microscopio óptico simple (**Tabla 2**). Esta técnica utilizada pudo ser una limitante en el estudio ya que a pesar de todas estas ventajas no evalúa directamente las roturas del ADN como lo hacen otras técnicas más costosas como el TUNEL o el SCSA. (Gill et al., 2019)

Otra posible limitante del estudio, fueron algunas variables importantes que pudieron ser influyentes en el resultado, pero que no se pudieron obtener. Estas variables son, por ejemplo: ocupación, existencia de alguna enfermedad, lugar de procedencia, frecuencia del consumo de sustancias tóxicas. (Cortés, 2017)

El presente estudio se realizó con el objetivo de encontrar y entender mejor la relación existente entre el IFA y los parámetros seminales más estudiados que son utilizados como información diagnóstica sobre la fertilidad masculina en el laboratorio de reproducción asistida. Además, nos ha permitido darnos cuenta de la importancia del test de fragmentación del ADN espermático, ya que se ha visto que, si bien tiene una relación

con la calidad seminal, esto no siempre se cumple en todos los casos y se requiere incrementar los estudios posteriores con un mayor número de variables directamente relacionadas con el paciente.

En un estudio realizado en Argentina, analizar la integridad del ADN del espermatozoide previo a algún procedimiento de reproducción asistida es importante porque se ha comprobado su relación con bajas tasas de crecimiento embrionario y a su vez con un bajo éxito de embarazos alrededor del mundo. (Alvarez et al., 2017) Por otro lado, una reciente investigación en Irán concluyó que un alto daño en el ADN espermático está asociado con abortos espontáneos y una pobre calidad embrionaria. (Rashki et al., 2021)

Dicho esto, en el presente estudio se ha encontrado que no todos los pacientes con IFA alto tienen los parámetros seminales alterados. Y ya que un material genético dañado puede tener fuertes implicancias en el desarrollo embrionario; se debe considerar la evaluación de la integridad del ADN como un análisis individual a cada paciente además del espermatograma. (Evgeni et al., 2015)

Un estudio realizado en Chiclayo asegura y recomienda que es necesario realizar el test de fragmentación de ADN espermático como prueba de rutina ya que el espermatograma no brinda la suficiente información necesaria sobre la infertilidad del paciente. (Acosta et al., 2015) Según un estudio realizado en Lima, implementar el IFA en el análisis seminal permite abordar con mejor certeza en la selección de espermatozoides con menor fragmentación del ADN previos a los procedimientos de reproducción asistida, de allí su importancia en implementarla en los centros de fertilidad. (Portella et al., 2013)

VI CONCLUSIONES

1. Existe una relación entre el IFA y los parámetros rutinariamente estudiados en pacientes con problemas de fertilidad que residen en el Perú.
2. Se encontró una correlación inversa y significativa entre el IFA y la morfología normal.
3. Se encontró una correlación inversa y significativa entre el IFA y la concentración espermática.
4. Se encontró una correlación inversa y significativa entre el IFA y la motilidad progresiva.

VII RECOMENDACIONES

1. Con más información acerca del paciente, cómo por ejemplo su ocupación, frecuencia en el consumo de sustancias tóxicas e incluso la existencia de enfermedades previas, será posible la realización de mayores estudios a futuro y con una mayor exactitud en los resultados.
2. No se consideró como variable la altura ya que no se tuvo registros de procedencia de los pacientes. Se recomienda evaluarla para futuros estudios ya que la hipoxia tiene notables repercusiones en la calidad seminal.
3. Esta investigación puede servir como base para la implementación de nuevos estudios en dicho centro de fertilidad a futuro.
4. Es importante recalcar al médico tratante la importancia de la fragmentación del ADN en la calidad seminal. Así como sabemos que la fragmentación espermática es afectada al aumentar la edad del paciente, adultos mayores aún siguen concurriendo a centros de fertilidad en el Perú, por lo que es fundamental realizar estudios sobre el impacto que tiene este hallazgo en los casos de niños nacidos y las complicaciones genéticas que esto conlleva.
5. Se recomienda incluir en la malla curricular de la carrera de Biología el curso de reproducción asistida en los últimos años de carrera, como un curso teórico - práctico que abarque conocimientos de genética reproductiva, fisiología reproductiva y embriología como un todo, para un mejor entendimiento de esta tan importante rama de la biología.

VIII BIBLIOGRAFÍA

Acosta, L., Rivas, C., Chiscul, L., & Diaz, J. (2015). Correlación entre los parámetros seminales, fragmentación de ADN espermático y estrés oxidativo en pacientes atendidos en un centro de fertilidad en el norte del Perú. *Revista Iberoamericana De Fertilidad Y Reproducción Humana*, 32(4)

Agarwal, A., Gupta, S., Du Plessis, S., Sharma, R., Esteves, S. C., Cirenza, C., Eliwa, J., Al-Najjar, W., Kumaresan, D., Haroun, N., Philby, S., & Sabanegh, E. (2016). Abstinence Time and Its Impact on Basic and Advanced Semen Parameters. *Urology*, 94, 102-110. 10.1016/j.urology.2016.03.059

Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Panner Selvam, M. K., Cho, C. L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosie, C., Parekh, N., Alves, M. G., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., . . . Shah, R. (2020). Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *The World Journal of Men's Health*, 38(4), 412-471. 10.5534/wjmh.200128

Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 1310.1186/s12958-015-0032-1

Alcántara, D. (2020). Efecto de la hipoxia hipobárica crónica intermitente en los niveles de antígeno prostático específico (psa) de mineros chilenos. [Tesis doctoral, Universidad de Chile]. Repositorio institucional de la Universidad de Chile <http://campusesp.uchile.cl:8080/dspace/handle/123456789/716>

Alvarez Sedó, C., Bilinski, M., Lorenzi, D., Uriondo, H., Noblía, F., Longobucco, V., Lagar, E. V., & Nodar, F. (2017). Effect of sperm DNA fragmentation on embryo

development: clinical and biological aspects. *JBRA assisted reproduction*, 21(4), 343–350. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20170061>

Alwan, B. A., Yassen, N. S., & Rahim, A. I. (2020). Correlation of sperm DNA Fragmentation Index (DFI) with conventional semen parameters in infertile couples undergoing IUI cycles. *EurAsian Journal of BioSciences*, 14(2), 7263-7267. <https://bibvirtual.upch.edu.pe:2181/scholarly-journals/correlation-sperm-dna-fragmentation-index-dfi/docview/2568034882/se-2?accountid=42404>

Ascenso, A. (2018). Biología en reproducción asistida: Introducción. *Revista Peruana De Ginecología Y Obstetricia*, 64(2), 211-212. 10.31403/rpgo. v64i2080

Choy, J. T., & Amory, J. K. (2020). *Non-surgical Management of Oligozoospermia. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. doi:10.1210/clinem/dgaa390

Comar, V. A., Petersen, C. G., Mauri, A. L., Mattila, M., Vagnini, L. D., Renzi, A., Petersen, B., Nicoletti, A., Dieamant, F., Oliveira, J., Baruffi, R., & Franco, J. G., Jr (2017). Influence of the abstinence period on human sperm quality: analysis of 2,458 semen samples. *JBRA assisted reproduction*, 21(4), 306–312. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20170052>

Cortés, M. (2017). Daño en el adn mitocondrial producido por tóxicos: evaluación y efectos en la fertilidad masculina. *UBO Healt Journal*, 4, 5-18.

Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C., Fernández, J.L., & Gosálvez, J. (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*, 31(2), 120-131.

Danis, R., & Samplaski, M. (2019). Sperm Morphology: History, Challenges, and Impact on Natural and Assisted Fertility. *Current Urology Reports*, 20(8), 1-8. 10.1007/s11934-019-0911-7

Dos Santos, T & D'Ávila, M. (2020). Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote*, 28(1), 1-8. <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199419000595>

Eddington, D. 2015. Statistics for Linguists: a Step-by-Step Guide for Novices. Newcastle upon Tyne: Cambridge Scholars Publishing.

Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65(5), 979-991. [10.1016/j.theriogenology.2005.09.011](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.011)

Evgeni, E., Lymberopoulos, G., Gazouli, M., & Asimakopoulos, B. (2015). Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 188, 17–23.

Fernández, J. L., Johnston, S., & Gosálvez, J. (2018). Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Assay. Springer International Publishing. [10.1007/978-3-319-71815-6_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71815-6_8)

Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S., & Fardilha, M. (2017). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of Reproduction*, 96(1), 2-12. [10.1095/biolreprod.116.144337](https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144337)

Ganzer, L., Kuperman, N., Georgiott, T., Palena, C., Tissera, A., Estofan, D., & Ganzer, L. (2017). Relación entre parámetros seminales y fragmentación del ADN espermático.

Gill, K., Rosiak-Gill, A., Jakubik, J., Patorski, L., Lukaszuk, M., & Piasecka, M. (2019). The higher risk for sperm DNA damage in infertile men. VM Media SP. zo.o VM Group SK. [10.5603/gp.2019.0117](https://doi.org/10.5603/gp.2019.0117)

Gosálvez, J., López-Fernández, C., & Fernández, J. L. (2011). Sperm Chromatin Dispersion Test: Technical Aspects and Clinical Applications. Springer New York. [10.1007/978-1-4419-6857-9_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_10)

Guo, L., Zhou, H., Liu, M., Li, Q., & Sun, X. (2020). Male age is more critical to sperm DNA integrity than routine semen parameters in Chinese infertile males. *Andrologia*, 52(1), e13449-n/a. 10.1111/and.13449

Hanson, B. M., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Carrell, D. T., & Hotaling, J. M. (2018). The impact of ejaculatory abstinence on semen analysis parameters: a systematic review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(2), 213-220. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-017-1086-0>

Javed, A., Talkad, M. S., & Ramaiah, M. K. (2019). Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 46(1), 14-21. 10.5653/cerm.2019.46.1.14

Lilja, H., & Laurell, C. (1984). Liquefaction of coagulated human semen. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 44(5), 447-452. 10.3109/00365518409083836

Magalhães, J. A., Ribeiro, L. S., Rego, J. P. A., & Andrade, C. R. D. (2021). *Current markers for infertility in men*. GN1 Genesis Network. 10.5935/1518-0557.20210013

Minh Tam Le, Tam An Thi Nguyen, Hiep Tuyet Thi Nguyen, Thai Thanh Thi Nguyen, Nguyen, V. T., Dinh Duong Le, Vu Quoc Huy Nguyen, & Ngoc Thanh Cao. (2019). Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters? *Reproductive Medicine and Biology*, 18(4), 390-396. <http://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12297>

Nussbaum, R., McInnes, R., & Willard, H. (2015). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* (8th ed.). Elsevier.

OMS. (2021) Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Sixth Edition. World Health Organization. *The World Journal of men's Health*, 3910.5534/wjmh.210074

Petersen CG, Mauri AL, Vagnini LD, et al. The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples. *JBRA Assist Reprod.* 2018;22(4):323-330. Published 2018 Nov 1. doi:10.5935/1518-0557.20180047

Pino, V., Sanz, A., Valdés, N., Crosby, J., & Mackenna, A. (2020). The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *JBRA assisted reproduction*, 24(1), 82–86. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.201900>

Portella, J., & Gonzales, G. (2016). Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Revista De Ginecología Y Obstetricia De México*, 84(7), 462-473

Portella, J., Lopez, R., Noriega-Hoces, L., & Guzman, L. (2013). Modelo predictivo de fragmentación de ADN espermático usando parámetros evaluados en un espermatograma. *Revista Peruana De Ginecología Y Obstetricia*, 60(1), 11-14. 10.31403/rpgo.v60i103

Quintero, G. A., Bermúdez, R. M., & Castillo, J. (2015). Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: un problema actual. *Tip*, 18(2), 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.006>

Rashki Ghaleno, L., Alizadeh, A., Drevet, J. R., Shahverdi, A., & Valojerdi, M. R. (2021). Oxidation of Sperm DNA and Male Infertility. *Antioxidants*, 10(1), 97. doi:10.3390/antiox10010097

Rex, A. S., Aagaard, J., & Fedder, J. (2017). DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology*, 5(4), 622–630. <https://doi.org/10.1111/andr.12381>

Roque, A., Ponte, I., & Suau, P. (2011). Secondary structure of protamine in sperm nuclei: an infrared spectroscopy study. *BMC Structural Biology*, 11, 14. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6807-11-14>

Rosiak-Gill, A., Gill, K., Jakubik, J., Fraczek, M., Patorski, L., Gaczarzewicz, D., Kurzawa, R., Kurpisz, M., & Piasecka, M. (2019). Age-related changes in human sperm DNA integrity. *Aging*, 11(15), 5399–5411. <https://doi.org/10.18632/aging.102120>

Rubes, J., Sipek, J., Kopecka, V., Musilova, P., Vozdova, M., Prinosilova, P., Topinka, J., Pastorkova, A., Svecova, V., & Sram, R. J. (2021). The effects of age on DNA fragmentation, the condensation of chromatin and conventional semen parameters in healthy nonsmoking men exposed to traffic air pollution. *Health Science Reports*, 4(2), e260-n/a. 10.1002/hsr2.260

Sadeghi M. (2021). The Possibility of Increasing Oocyte Capacity to Repair Sperm DNA Fragmentation. *Journal of reproduction & infertility*, 22(2), 75–76. <https://doi.org/10.18502/jri.v22i2.5805>

Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P. G., & Bianchi, U. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*, 4(1), 31-37. 10.1530/revreprod/4.1.31

Tirado, R. A., Ñiquen, G. C., Padilla De La Cruz, Lizeth, Díaz Peláez, M., Gonzales Daga, J., Vásquez, J., & Vásquez, J. (2021). First baby achieved by in vitro fertilization in the Peruvian Amazon. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 67(1). <http://www.spog.org.pe/web/revista/index.php/RPGO/article/view/2308>

Turek, P. J. (2021). Campbell-Walsh-Wein Urology (12th ed.). Elsevier

Vargas, A., Bustos-Obregón, E., & Hartley, R. (2011). Effects of hypoxia on epididymal sperm parameters and protective role of ibuprofen and melatonin. *Biological Research*, 44(2), 161-167. 10.4067/S0716-97602011000200008

Xue, L., Wang, R., He, B., Mo, W., Huang, L., Wang, S., Mao, X., Cheng, J., Huang, Y., & Liu, R. (2016). Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *The*

Journal of International Medical Research, 44(6), 1283-1291.

10.1177/0300060516664240