



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN DE NÚCLEOS  
AISLADOS E INTACTOS DE ESPERMATOZOIDES HUMANO**

Tesis para obtener el título de

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

**REBECA ANAID BAÑOS NOCEDAL**

**TUTOR: DR. JUAN CARLOS FLORES ALONSO**

AGOSTO, 2016.



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Carlos Flores Alonso, por haberme aceptado en el proyecto de investigación para mi tesis de licenciatura, en el laboratorio de Biología de la Reproducción del Centro de Investigación Biomédica de Oriente- I.M.S.S., en el Hospital General de Zona #5, Km. 4.5, Carretera Atlixco-Metepec y al

A la Dra. Rosalina Reyes Luna y M.C. Ubaldo Quiroz López por haber aceptado ser mis asesores de tesis y por sus valiosas sugerencias otorgadas en la realización de este proyecto.

A toda mi familia. A mis padres Agustín Baños y Rebeca Nocedal por haberme alentado y apoyado siempre... por haberme dado todo, pero más que nada, gracias por ser un ejemplo de vida. A mi hermano Axel Baños por enseñarme todo lo que no hicieron mis padres, por sus consejos, por ser el mejor hermano que pude tener. A mi cuñada Guiovanna Vera por ser la otra parte de hermana que no tuve y más que nada, gracias a los dos por darme lo más dulce y hermoso que tengo en mi vida... mi sobrina Eva Guiovanna Baños Vera. A mi abuela Felipa Rivera por ser como una madre para mí, por todo su amor a lo largo de toda mi vida. A Luis Miguel Benedet por ser mi compañero y apoyo incondicional a lo largo de este proceso. A todos mis tíos y primos por su constante preocupación por mí. A mis amigos Stephanie, Belem, Erika, Thelma, Ingrid, Nestor, Flores, Alejandro Tello, Ordoñez, Johnathan por su compañía y apoyo a lo largo de mi vida.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
1.1 La infertilidad y la repercusión social.....	6
1.2 Causas que afectan la fertilidad de la pareja.....	8
1.3 Infertilidad Masculina.....	8
1.4 Principales fallas en la calidad seminal del varón.....	9
1.5 Calidad del ADN en espermatozoides.....	10
1.6 Técnicas para evaluar la fragmentación del ADN en espermatozoides.....	12
1.7 Antecedentes y Planteamiento del Problema.....	15
<b>2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo general.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Muestras de semen.....	20
3.2 Parámetros evaluados en la espermatobioscopia.....	20
3.2.1 Concentración.....	20
3.2.2 Análisis microscópico.....	21
3.2.3 Evaluación de la morfología.....	21
3.2.4 Viabilidad celular.....	21
3.3 Procesamiento de las muestras de semen .....	22

<b>3.4 Obtención de Núcleos Aislados.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5 Determinación de la fragmentación del ADN a través de la prueba TUNEL.....</b>	<b>23</b>
<b>3.6 Determinación de la fragmentación del ADN a través de la prueba COMETA.....</b>	<b>23</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Determinación de la fragmentación de espermatozoides y sus núcleos a través de la prueba COMETA.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Determinación de la fragmentación de espermatozoides y sus núcleos a través de la prueba TUNEL.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3 Concentración celular de la muestra de espermatozoides humanos y sus núcleos aislados.....</b>	<b>30</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>36</b>

## RESUMEN

En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud ha considerado a la infertilidad como un problema de salud pública. La infertilidad es una alteración en la salud humana que afecta del 15-20% de las parejas en edad reproductiva. Sin embargo aunque la infertilidad implica una deficiencia que no compromete la integridad física del individuo ni amenaza su vida, dicha deficiencia puede tener un impacto negativo sobre el desarrollo del individuo, acarrea consecuencias sociales y psicológicas.

La infertilidad es debida a diversas causas, no obstante, el factor masculino juega un papel de aproximadamente el 50% de infertilidad en la pareja. Diversos trabajos han demostrados que la integridad del ADN del espermatozoide está muy relacionada con las probabilidades de fertilización, implantación y desarrollo del embrión. Para evaluar la fertilidad en varones, hoy en día se utilizan los mismos parámetros; morfología, movilidad, concentración espermática, sin embargo esto no nos indica la calidad del ADN. Para medir el grado de fragmentación del ADN espermático, se han implementado diferentes técnicas que han servido para relacionar dicha fragmentación con la infertilidad masculina. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la fragmentación del ADN espermático, a través de la obtención de sus núcleos aislados y analizados a través de dos técnicas: TUNEL y Cometa.

Los resultados obtenidos muestran que los espermatozoides humanos con fragmentación en su ADN son eliminados con el tratamiento para la obtención de núcleos aislados y que estos últimos no presentan fragmentación de ADN.

## **INTRODUCCION**

En los últimos años, la infertilidad ha tomado una relevancia importante debido al incremento en el número de parejas que padecen este problema. A lo largo de los años se ha analizado las causas de la infertilidad y se han identificado diferentes factores, tanto en mujeres como en hombres, pero la responsabilidad en la reproducción siempre se le ha dado un mayor peso a la mujer que al hombre.

### **1.1 La infertilidad y su repercusión social**

La infertilidad puede provocar serios trastornos emocionales en aquellos que la padecen, afectando profundamente aspectos importantes en su vida. Los hijos contribuyen a la felicidad de una pareja, ya que son la expresión de la relación. Sin embargo, las parejas que padecen de infertilidad, se ven constantemente expuestas a complicaciones familiares, sociales y médicas. Esto genera tensiones psicológicas que también van a repercutir en la misma infertilidad, haciendo de este mal un problema tanto social, psicológico, económico y de salud.

El estilo de vida y las necesidades que tienen las parejas hoy en día a llegado a influir en postergar el momento de ser padres, siendo este un factor relacionado al incremento de problemas de infertilidad. Aproximadamente se tenía de un 15 a 20 por ciento de parejas afectadas con este problema, hoy con los cambios sociales y costumbres que han venido a modificar el estilo de vida, el incrementa es del 23 por ciento. El impacto psicológico es muy grande y hasta un 40 por ciento de las parejas abandonan el tratamiento, tanto por factores emocionales, sociales y por factores económicos (Daniluk, 2001).

La etapa más adecuada para un embarazo es entre los 23 y 30 años en mujeres y entre los 25 y 30 años en hombres; aunque en realidad el límite depende de cada pareja y de su capacidad de seguir generando óvulos y espermatozoides, respectivamente. Sin embargo, al postergar el embarazo las probabilidades de lograrlo se reduce. Pero el problema en realidad es que, en promedio, las parejas

tardan cuatro años en buscar ayuda de un especialista. Esto quiere decir que si deciden tener un bebé a los 35 años y no logran concebir, llegarían con el especialista al cumplir 39, con lo que se reducen de manera importante las posibilidades de lograr el embarazo.

Pero independientemente de la edad en la cual se desee tener un hijo, lo ideal es acudir a una consulta con el ginecólogo antes para que el especialista haga una evaluación inicial y vea si hay algún problema desde el principio.

Las causas de la infertilidad en una pareja se encuentran en un 50% mujeres y un 50% en los hombres. De ahí la importancia de que las clínicas a las que se acudan por ayuda exista un tratamiento enfocada a la pareja (Daniluk, 2001).

La mayor parte de las investigaciones que han intentado conocer las repercusiones de la infertilidad en la vida de las personas, a lo largo de los últimos cuarenta años, se han llevado a cabo en países desarrollados occidentales. Sin embargo, no debe olvidarse que las repercusiones de la infertilidad en la vida de las personas no son las mismas en los países desarrollados occidentales, en los que el bienestar económico-social está básicamente asegurado y no guarda relación directa con la paternidad biológica, que en otros países en vías de desarrollo, o desarrollados pero en los que todavía persiste una concepción de las sociedades donde las estructuras familiares siguen manteniendo el entramado social-económico por encima de cualquier otra estructura social (Forrest y Gilbert, 1992).

Aun en los mejores momentos, la economía ejerce una enorme presión en las relaciones de pareja. Con el deseo frustrado de ser padres, sumado a los altos costos de los tratamientos de fertilidad.

No todos los mexicanos que requieren de tratamientos de reproducción asistida, tienen suerte. En México, 70% de los procesos de infertilidad son de baja complejidad, pero solo tres de cada diez casos reciben atención, parte de este problema radica en que el 95% de los servicios de infertilidad se realizan en

consultorios y clínicas privadas; por lo que las parejas de bajos recursos no pueden recibir atención (Moreno-Rosset, 2004).

## **1.2 Causas que afectan la fertilidad de la pareja.**

La infertilidad y su relación con los hábitos tóxicos, han sido motivo de investigación ya que algunos agentes ambientales tóxicos deterioran la espermatogénesis, provocando efectos nocivos a nivel testicular. Uno de los agentes tóxicos más conocidos, es el tabaco, la integridad del ADN de los espermatozoides de hombres fumadores esta significativamente alterada con respecto de los no fumadores (Henkel *et al.*, 2003).

En las mujeres las principales causas que han incrementado el número de casos de infertilidad en los últimos cinco años se encuentra el aumento en el consumo de alcohol, cigarro y actividad física mayor a las 2 horas diarias, además de la postergación de la maternidad por factores profesionales (Valentine,1986).

Aunque también existe un porcentaje de mujeres que no logra embarazarse por enfermedades adquiridas como la endometriosis.

En el caso de los hombres, también influyen los factores sociales como el excesivo consumo de alcohol, así como a otros padecimientos como el descenso tardío de los testículos, traumatismos en la bolsa escrotal, enfermedades como varicocele, várices en los testículos, parotiditis en la etapa adolescente y prostatitis (Hermo *et al.*, 2010).

## **1.3 Infertilidad Masculina**

En estos últimos años, el incremento de la infertilidad en varones ha aumentado por diferentes factores, siendo el daño en el aparato reproductor, las alteraciones en el control neuroendocrino de la regulación de la espermatogénesis y los factores genéticos, las principales etiologías de la infertilidad masculina (Gibson y Ahmad, 2013).



La infertilidad es una condición que afecta entre el 20 al 25% de las parejas en edad reproductiva a nivel mundial (WHO, 2010). Y el incremento en el número de parejas infértiles se ha relacionado con el estilo de vida, la condición de salud y el uso de sustancias tóxicas, provocando alteraciones en la espermatogénesis, originando espermatozoides con alteraciones o daños en su ADN (Aitken y Koppers, 2011).

#### **1.4 Principales fallas en calidad seminal del varón**

Los problemas con la producción y el desarrollo de los espermatozoides son los más comunes en la infertilidad masculina. Los espermatozoides pueden no estar completamente desarrollados, pueden tener forma anormal o ser incapaz de moverse normalmente. Los factores más comunes de infertilidad masculina son, trastornos en los espermatozoides como oligospermia y azoospermia, varicocele, eyaculación retrograda, infertilidad inmunológica, hormonal, genética y medicamentos.

**Oligospermia:** se trata de la alteración seminal caracterizada por la concentración disminuida de espermatozoides, lo cual puede dificultar o incluso imposibilitar la concepción normal.

**Azoospermia:** alteración caracterizada por la falta de espermatozoides.

- Azoospermia secretora: los testículos no son capaces de producir espermatozoides.
- Azoospermia obstructiva: los testículos si producen espermatozoides pero existe un problema en los conductos deferentes que se encargan de transportarlos hasta la uretra donde se expulsa el eyaculado.

**Varicocele:** en venas escrotales dilatadas que están presentes en un 16 % de los hombres pero que son más comunes en los hombres infértiles un 40%, inhiben el desarrollo de espermatozoides porque evitan que haya un flujo adecuado de sangre.

**Eyaculación retrograda:** ocasionada por una falla de los nervios y los músculos del cuello de la vejiga o de los músculos responsables de la apertura en la uretra que no se cierran durante el orgasmo, lo que hace que el semen retroceda hasta la vejiga en vez de salir por el pene.

**Infertilidad inmunológica:** está causada por la respuesta inmunológica del hombre a sus propios espermatozoides, los anticuerpos normalmente son el resultado de lesiones, cirugías o infecciones. Al atacar a los espermatozoides evitan que tengan un movimiento y una función normal.

**Hormonas:** responsables de estimular a los testículos para que produzcan espermatozoides, las hormonas de la glándula hipófisis tienen una participación importantísima en la fertilidad. Por lo tanto, cuando los niveles de hormonas son extremadamente bajos, el resultado puede ser un bajo desarrollo de espermatozoides.

**Genética:** la genética tiene una participación central en la fertilidad, en particular porque el espermatozoide lleva la mitad del DNA del hombre al óvulo de su compañera. La presencia de anomalías en la cantidad de cromosomas y en su estructura, así como partes faltantes en el cromosoma y que está presente en los hombres normales, también pueden tener un impacto sobre la fertilidad.

**Medicamentos:** hay ciertos medicamentos que afectan la producción de espermatozoides, la función de los espermatozoides y la eyaculación.

### **1.5 Calidad del ADN en espermatozoides**

La calidad del ADN espermático es trascendente para el desarrollo y llevar a término la gestación. Cuando hay daño en el ADN espermático influye con la vida y da lugar a niños con diversas anomalías (Agarwal y Allamaneni, 2005). La calidad del ADN espermático implica la integridad de la cromatina del espermatozoide, siendo así un factor importante para iniciar y llevar a término la gestación. Se ha señalado que la lesión del ADN espermático, puede dar lugar a un mal desarrollo embrionario, como fallas en la implantación de embriones y

abortos en fases tardías de la gestación (Silvia y Gadella, 2006; Agarwal y Alamaneni, 2005; O´Brien y Zini, 2005).

El espermatozoide, a diferencia de las células somáticas, posee una cromatina empaquetada principalmente por protaminas en lugar de histonas. Las protaminas son proteínas pequeñas y con pH básico, debido a su alto contenido de lisina, cisteína y arginina. Esto le proporciona gran estabilidad y resistencia al núcleo espermático, llegando con su ADN intacto hasta el sitio de fecundación

La fragmentación del ADN espermático puede observarse en semen proveniente de individuos con procesos infecciosos, traumas o afecciones testiculares (Agarwal y Alamaneni, 2005; Agarwal y Said, 2003, Ollero *et al.*, 2001). Las causas de la fragmentación en el ADN espermático, es el defecto del empaquetamiento del ADN espermático, donde la presencia de roturas en la cadena de ADN, se relaciona con el intercambio del complejo de histonas por el de protaminas que ocurre en el proceso de espermiogénesis. El intercambio de este, dirige una mayor compactación de la molécula de ADN, por el super-enrollamiento dado por las histonas. Por estas tensiones y para facilitar el reemplazo de histonas por protaminas, se genera un nivel de roturas en el ADN que serán reparadas posteriormente (Leduc *et al.*, 2008).

El proceso apoptótico celular, también es responsable de la fragmentación ADN espermático, ya que este se inicia en la espermatogénesis, momento en el cual algunas células que serán eliminadas se escapan de este proceso. La apoptosis, mecanismo que induce la muerte de la célula cuando presenta alguna alteración en su fisiología o por su vejez, tiene un papel importante en la responsabilidad de la fragmentación del ADN espermático. La apoptosis de células espermáticas puede iniciar en la espermatogénesis, donde se eliminaran algunas células espermáticas que presentan alguna alteración, pero algunas escapan a este proceso; este proceso apoptótico podría deberse a la activación de endonucleasas, las cuales causan extensos cortes endógenos en la cadena de ADN y esto representa la inactivación o la eliminación del material genético defectuoso (Moustafa *et al.*, 2004). La salida de este tipo de células espermáticas

en el eyaculado, indica un proceso apoptótico interrumpido y como consecuencia, una disminución en la calidad del ADN espermático.

Durante la última década, un área de investigación que ha sido estudiada ampliamente, como causa de infertilidad masculina, es la integridad del ADN en el núcleo del espermatozoide maduro eyaculado. Estudios recientes han mostrado que más del 20% de los casos de infertilidad masculina están relacionados a calidad del ADN espermático. Además, algunos reportes han mostrado que la gestación natural es nula en pacientes cuyas muestras presentan más del 30% de espermatozoides con fragmentación en el ADN, y además se presentan abortos de unos 1.7 veces más frecuentes (Agarwal y Said, 2003).

Las técnicas que se utilizan en la actualidad para determinar la infertilidad en varones, dan a conocer los parámetros de calidad del semen e indican la posibilidad que tienen los espermatozoides de encontrarse con el ovocito, sin embargo no aportan información sobre la calidad del ADN que contienen ya que este último es el que va a interactuar con el material genético del ovocito (Perez-Llano *et al.*, 2010). Por todo esto, la calidad del ADN espermático, es un factor determinante para la reproducción.

### **1.6 Técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático**

Diferentes técnicas se han desarrollado para la evaluación de la fragmentación del ADN espermático.

**La Prueba TUNEL** (Transferase-mediated d-UTP Nick End Labelling) incorpora desoxiuridina biotinilada al grupo OH del extremo 3' del ADN afectado. La biotina actúa como señal y puede ser detectada fácilmente, a través de técnicas fluorescentes. Los espermatozoides con ADN fragmentado se tiñen con mucha intensidad, mientras más fragmentado sea el ADN mayor será la señal resultante; se basa en el principio de que la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) incorpora dUTP en roturas de cadenas dobles o simples del ADN. En concreto, en

el ensayo se incorpora desoxiuridina biotinilada al 3'OH del ADN. La biotina actúa como señal y puede ser detectada fácilmente, por ejemplo, a través de técnicas fluorescentes. Cuantas más roturas tenga el ADN mayor será la señal resultante. (Cortes-Gutierrez *et al.*, 2007; Agarwal y Allamaneni, 2005; Evenson *et al.*, 2002).

**El SCSA** (sperm chromatin structure assay) se basa en el principio de que la cromatina anormal presenta una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente. El grado de desnaturalización resultante como consecuencia de su tratamiento mediante calor o con ácido se determina midiendo el cambio metacromático del colorante naranja de acridina de fluorescencia verde (AO intercalado) a una fluorescencia roja (AO sin intercalar). Los resultados se expresan como el índice de fragmentación de ADN. Dado que los resultados del SCSA son más constantes en períodos prolongados que los parámetros de la OMS, esta técnica resulta apropiada en estudios epidemiológicos de la esterilidad masculina. El SCSA se ha usado para predecir la capacidad de fertilización, implantación y embarazo tras las técnicas de reproducción asistida (TRA). Los resultados de SCSA también se han correlacionado con la fertilidad *in vivo*.

**La técnica de fluorescencia por Anaranjado de Acridina**, a través del grado de desnaturalización el tratamiento mediante calor o ácido, se determina midiendo el cambio metacromático del colorante naranja de acridina. Este fluorocromo tiene la capacidad de intercalarse entre las dos cadenas de ADN, que al ser excitado emite el color verde, pero presenta emisión rojo-naranja si se le incorpora al ADN de cadena simple. Siendo así las células se someten a una prueba de citometría de flujo para discriminar entre tipos de colores (Cortes-Gutierrez *et al.*, 2007; Agarwal y Allamaneni, 2005; Evenson *et al.*, 2002; Larson *et al.*, 2000).

**La prueba COMETA**, basada en la descondensación del ADN y migración a través de un campo electroforético, permite evaluar la fragmentación del ADN del espermatozoide cuando es puesto en un gel y sometido a la acción de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se desplazan generando una imagen en forma de

cometa. El daño en el ADN es medida por la longitud de la cola generada (Cortes-Gutierrez *et al.*, 2007; Agarwal y Allamaneni, 2005; Agarwad y Said, 2003; Evenson *et al.*, 2002).

**La DBD-FISH** (DNA Breakage Detection-Fluorescence in situ Hybridization) esta basada en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas o acidas suaves de producir una desnaturalización del ADN a partir de los extremos de roturas del doble cadena o de cadena sencilla. Después de la desnaturalización y extracción de las proteínas, utilizando una solución de lisis, el ADN de cadena sencilla puede hibridarse con una sonda de ADN, marcada con un fluorocromo. Mientras más desnaturalización exista en la cadena de ADN, mayor será el nivel de marcado que exista en el núcleo (Cortes-Gutierrez *et al.*, 2007; Enciso *et al.*, 2010).

**El SCD** (sperm chromatin dispersion test) es el análisis de los niveles de la fragmentación de la cadena de ADN. Esta técnica utiliza una solución de digestión para disgregar la membrana celular del espermatozoide y permitir la salida del ADN, una vez digerida la muestra de semen es impregnada con un fluorocromo (ioduro de propilo) para ser evaluadas bajo un microscopio de fluorescencia, para observar la dispersión de cromatina espermática (Cortes-Gutiérrez *et al.*, 2007; Gosálvez *et al.*, 2007; Enciso *et al.*, 2010; Pérez-Llano *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2005).

**Núcleos Aislados** basada en la remoción de la membrana celular y nuclear, como la eliminación del flagelo, a través de una serie de sustancias, tales como (DTT) y (CTAB) para pasar por un proceso de centrifugación e incubación y después observar al núcleo.

Otras técnicas utilizadas para medir el daño al ADN, detectan la fragmentación pero involucran la lisis de una población de células de modo que ellas miden la media de la respuesta de las células individuales y no la respuesta de cada célula.

Con PCA es posible obtener imágenes, lo que facilita la observación y el análisis, además de que su costo es sumamente bajo, por lo que es una excelente herramienta para la detección de agentes genotóxicos, bastan sólo unas cuantas

células (1-10,000) para realizar el ensayo y los resultados se obtienen en un día. Con esta prueba se estudió la inducción de daño sobre el ADN en células cultivadas y en suspensión, así como en sistemas in vivo. La PCA tiene varias ventajas:

- Es posible investigar el grado de rompimiento del ADN en pequeñas muestras de tejidos animales y biopsias humanas.
- Se lleva a cabo en pocas horas y, si se cuenta con un analizador de imágenes, los resultados son obtenidos y evaluados inmediatamente.
- En términos generales, el equipamiento es el mismo utilizado para otros ensayos de poca duración con excepción del analizador de imágenes.

A pesar del desarrollo de metodologías que permitan identificar espermatozoides con ADN fragmentado, aun no están disponibles a toda la población debido al alto costo del procedimiento y al uso de equipos sofisticados.

### **1.7 Antecedentes y Planteamiento del problema**

La infertilidad puede ser definida como la incapacidad de completar un embarazo después de un determinado tiempo de tener relaciones sexuales y sin tomar medidas anticonceptivas. Las causas del incremento en la prevalencia en la infertilidad son difíciles de establecer. Esto podría deberse por lo menos a factores tales como: postergación del momento en que se decide tener hijos, alteraciones en la calidad del semen debido a hábitos como el tabaquismo y el alcohol.

Como ya ha sido mostrado, la integridad del ADN espermático es un factor importante para determinar la capacidad fertilizante del varón, las probabilidades de implantación y el desarrollo del embrión. Sin embargo el análisis de esta característica no ha sido empleado en la búsqueda de la etiología de infertilidad de pacientes masculinos con infertilidad idiopática. Existen gran variedad de herramientas y metodologías (TUNEL, COMETA, SCSA, ETC) han sido

desarrolladas para determinar la integridad del ADN de espermatozoides; dichas metodologías, requieren de equipos sofisticados y que no están al alcance de la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos (Graham *et al.*, 1990).

El núcleo espermático, estructura semicristalina, debido a su alta organización de contenido, está formado por ADN y proteínas nucleares; estas tienen función estructural (compactación del ADN) y enzimática (reparación). La estructura y composición de la cromatina en el núcleo de los espermatozoides puede ser muy variable.

La cabeza del espermatozoide comprende al núcleo y al acrosoma y, en el humano, posee un largo aproximado de 5 a 6  $\mu\text{m}$  y un ancho de 2,5 a 3  $\mu\text{m}$ . Rodeando al núcleo del espermatozoide en la región acrosomal, se encuentra una sucesión de cuatro membranas fácilmente identificables por microscopía electrónica: desde afuera hacia adentro, éstas son la membrana plasmática o celular, las membranas acrosomales externa e interna y la membrana nuclear.

Las proteínas nucleares son muy importantes para la condensación de la cromatina espermática, proporcionando al núcleo, una estabilidad mecánica y química, para dar así la activación del genoma paterno.

Por otra parte, el eyaculado comúnmente contiene cantidades variables de espermatozoides que no han reemplazado la mayoría de sus histonas o proteínas transicionales por protaminas (Tanphaichitr *et al.*, 1978; Chevaillier *et al.*, 1987; Gatewood *et al.*, 1987). Estos núcleos que contienen cantidades anormales de histonas, se conocen generalmente como núcleos inmaduros (Kramer *et al.*, 1997) y se ha observado que el eyaculado de hombres infértiles contiene una mayor proporción de los mismos que el de hombres fértiles (Foresta *et al.*, 1992; Auger *et al.*, 1993). Se cree que la relación entre la deficiencia de protaminas y la infertilidad se encuentra vinculada a un ADN menos protegido, existencia de un incremento en la fragmentación del ADN como consecuencia de la falta de compactación (Agarwal *et al.*, 2004; Shamsi *et al.*, 2008).



Diversos estudios han demostrado que las protaminas son también esenciales durante la fertilización: cualquier alteración en los niveles de protaminas puede llevar a daños en el ADN del espermatozoide e impedir la fertilización (Balhorn *et al.*, 1988; Yu *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001). Se ha observado que la retención de más del 15% de histonas en estructuras nucleosomales resulta en una cromatina menos condensada y más sensible a factores externos.

Varios mecanismos pueden dañar la integridad del ADN del espermatozoide. Los factores etiológicos más frecuentes que alteran la calidad del ADN son el empaquetamiento anormal de la cromatina, las especies reactivas del oxígeno (ROS) y la apoptosis. La apoptosis en el testículo controla la sobreproducción de gametos masculinos y restringe los niveles de proliferación normal durante condiciones adversas en el desarrollo del espermatozoide (Sakkas *et al.*, 2006). Así también previene la proliferación de células germinales con daño en el ADN. Defectos en la remodelación del citoplasma durante la espermatogénesis puede llevar a la “apoptosis abortiva”, un fenómeno en el cual espermatozoides defectuosos escapan de la muerte programada y están presentes en el eyaculado.

Otro de los factores que ha tenido relevancia en los problemas de infertilidad masculina y que se ha incrementado de manera importante en la población es la obesidad. Diversos estudios muestran que la obesidad puede afectar la fertilidad a través de diferentes mecanismos los cuales pueden inducir disfunción eréctil o daños en la calidad del espermatozoide. Entre las cuales podemos encontrar:

- Mal funcionamiento del eje Hipotalámico-Hipofisis-testicular, lo que provoca que el perfil hormonal de personas obesas se modifique y reduzca la concentración de testosterona, gonadotropinas.
- Incremento en la liberación de las hormonas del tejido adiposo.
- Aumento en las adipocinas proinflamatorias, el incremento en la temperatura escrotal.

Todos los factores antes mencionados, incluyendo también la edad, el hábito de fumar, la exposición a atmósferas contaminantes y la abstinencia sexual

prolongada, pueden alterar la espermatogénesis y la función epididimaria comprometiendo la calidad de los gametos a través de reducir la densidad y movilidad celular e incrementar la fragmentación del ADN espermático.

Por otra parte, los **Núcleos Aislados** son estructuras de ADN obtenidos de la remoción de las membranas citoplasmática y acrosomal, y la eliminación del flagelo, a través de la incubación en agentes reductores (dithiothreitol) y detergentes catiónicos (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio) para pasar por un proceso de centrifugación e incubación y después observar al núcleo.

## **2. HIPOTESIS Y ANTECEDENTES**

En esta era de las tecnologías de reproducción asistida, existe creciente preocupación sobre la seguridad de la utilización del ADN dañado por los espermatozoides en este entorno.

En los últimos 25 años, varios métodos se han desarrollado para evaluar las roturas de la cadena de ADN en el espermatozoide. Actualmente, hay cuatro pruebas principales de la fragmentación del ADN de esperma, incluyendo el COMETA, TUNEL, ensayo de estructura de la cromatina de los espermatozoides (SCSA) y la prueba de naranja de acridina (AOT).

La fragmentación del ADN en el espermatozoide que fecunda un óvulo puede tener un impacto drástico en la ontogenia y, más tarde, la salud de la descendencia. Evenson (2002) mostró una relación significativa entre la fragmentación del ADN humano y el esperma de toro y la pérdida de potencial de fertilidad. Por lo tanto, la detección de daños en el ADN de esperma de mamífero puede ayudar a identificar a las personas con capacidad reducida para fertilizar óvulos o para iniciar un embarazo saludable.

El uso de pruebas ha sido impulsado en gran parte por la aparición de las tecnologías de reproducción asistida en humanos y animales. La parte económica puede resultar un problema, ya que la mayoría de los seguros de gastos médicos mayores no cubre los tratamientos para infertilidad, y estos gastos pueden ser de aproximadamente 100,000 pesos por procedimiento (entre medicamentos, análisis, tratamientos), sin que esto garantice un éxito, es decir, que no necesariamente sería el único gasto (Dunkel-Schetter y Lobel, 1991).

Todos los factores antes mencionados, incluyendo también la edad, el hábito de fumar, la exposición a atmósferas contaminantes y la abstinencia sexual prolongada, pueden alterar la espermatogénesis y la función epididimaria comprometiendo la calidad de los gametos a través de reducir la densidad y movilidad celular e incrementar la fragmentación del ADN espermático.

Por lo tanto, el desarrollo de nuevas técnicas de bajo costo que permitan determinar la calidad del ADN espermático, será de gran impacto sobre los costos de reproducción asistida, permitiendo el ahorro en el tratamiento de parejas con infertilidad.

## **2.1 Objetivo general**

Evaluar si la técnica para la obtención de núcleos aislados permite la eliminación de espermatozoides humanos con fragmentación en el ADN.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar el porcentaje de espermatozoides que son eliminados después del tratamiento empleado para la obtención de núcleos aislados.

- Evaluar la fragmentación de ADN en núcleos aislados y espermatozoides humanos a través de prueba COMETA.
- Evaluar la fragmentación de ADN en núcleos aislados y espermatozoides humanos a través de prueba TUNEL

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Muestras de semen**

Muestras de semen (n=10), fueron obtenidas por masturbación de donadores sanos y trasladadas al laboratorio de Biología de la Reproducción del Centro de Investigación Biomédica de Oriente – IMSS para su análisis. Las muestras fueron colocadas en una incubadora a 37°C, para favorecer la licuefacción y después se analizaron por espermatobioscopia directa siguiendo el manual de OMS (OMS 1999).

#### **3.2 Parámetros evaluados en la espermatobioscopia**

##### **3.2.1 Concentración**

La concentración de espermatozoides se determinó utilizando una cámara de Neubauer. Para ello se realizó una dilución de acuerdo al número de células por campo utilizando un objetivo 40x bajo microscopio de contraste de fase (Nikon Labophot). Después de haber determinado la dilución a realizar, se procedió a realizar y una alícuota se colocó en cámara de Neubauer para determinar la concentración de células por mililitro.

### 3.2.2 Análisis microscópico

Para determinar el porcentaje de células motiles, una alícuota de semen (10  $\mu$ l) se puso en un portaobjetos y se le colocó un cubreobjetos de 22 x 22 mm y se observó al microscopio de contraste de fase (Nikon Labophot) a 400 X. Se determinó el porcentaje de espermatozoides mótils sobre un total de 200 células evaluadas. Para evaluar la calidad de movimiento de los espermatozoides se determinó el grado de progresión de los mismos utilizando la escala propuesta por Mortimer (1986). Para el análisis de la motilidad espermática se separo en progresivos, *in situ* e inmóviles.

**Progresivos:** movimiento progresivo con alta velocidad.

***In situ*:** movimiento traslativo pero no muy progresivo.

**Inmóviles:** Sin movimiento

### 3.2.3 Evaluación de la morfología

Una alícuota de semen (10  $\mu$ l) se puso en un portaobjetos y se le colocó un cubreobjetos de 22 x 22 mm. Posteriormente se evaluó la morfología bajo microscopia de contraste de fases utilizando un objetivo 40X. Los espermatozoides con morfología anormal pueden presentar anomalías en la cabeza, la pieza intermedia y/o la cola. Según el criterio de la OMS valores iguales o superiores al 30% de espermatozoides con morfología normal es considerado normospermico.

### 3.2.4 Viabilidad celular

Para evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos, se usó el Kit Live/Dead sperm viability (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, una alícuota de 100  $\mu$ l de espermatozoides se mezcló con 10.0  $\mu$ l colorante Ioduro de Propidio y 1.0  $\mu$ l del colorante SYBR14. Posteriormente se

incubo a 37°C por 15 minutos y después se tomó una alícuota de 10 µl de la muestra y cuidadosamente se colocó en un porta y se observó por microscopia de fluorescencia utilizando filtros de excitación a 488 y 633 nm. Al cabo de dos minutos, se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos (fluorescencia verde) sobre un total de 200 espermatozoides evaluados mediante observación al microscopio de fluorescencia (Nikon E-600)

### **3.3 Procesamiento de las muestras de semen**

De cada una de las muestras se generaron dos alícuotas, con la misma cantidad; una como control, en la que se encontraban los espermatozoides íntegros y en la segunda alícuota, se sometieron los espermatozoides a la obtención de sus núcleos aislados, para la eliminación de la membrana en espermatozoides, contabilizando la concentración de la muestra antes y después de la obtención de nucleones. Después de esto, se evaluó el porcentaje de células con fragmentación en el ADN por microscopia de fluorescencia, prueba “COMETA” y “TÚNEL”, tanto para espermatozoides íntegros como para nucleones.

### **3.4 Obtención de Núcleos Aislados**

Se utilizaron alícuotas de 1 ml de Tris 50 mM (pH 8.0) en donde se colocó la muestra de espermatozoides y se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm, una vez de obtener el pellet, se retiró el sobrenadante, para añadirle una solución preparada de DL-Ditiotreitol 9 mM (DTT-Sigma Chemical, Co.) con 2 ml de un amortiguador de Tris 50 mM (pH 8.0), se les agregó 1 ml de la suspensión, al pellet previamente obtenido, se incubó a 37°C durante 10 minutos y se centrifugó. Al final de este periodo de tiempo se le agregó una solución con 50gr de N-Cetil-N, N, N-Trimetil bromuro de amonio (CTAB Merck, Co.) con 5ml de Tris 50 mM (pH 8.0), esta mezcla se añadió a la alícuota anterior sin quitar el sobrenadante, se incubó nuevamente a 37°C durante 10 minutos y se centrifugó. Las muestras de espermatozoides se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min para precipitar los nucleones y eliminar el sobrenadante.

### **3.5 Determinación de la fragmentación del ADN a través de prueba TUNEL**

La técnica TUNEL se empleo para la determinación de la fragmentación del ADN espermático. Se uso el kit Click-It TUNEL Alexa fluor 594 (Molecular Probes). Brevemente, se hicieron frotis de cada una de la muestras de espermatozoides de humanos y sus núcleos aislados, cada una de las muestras fueron fijadas con paraformaldehido al 4%, dejándolo por 15 minutos a temperatura ambiente, después del tiempo se removió el paraformaldehido y se le agrego 0.25% Triton X-100 con PBS, cubriendo por completo la muestra, se dejo 20 minutos a temperatura ambiente y se lavó con agua desionizada; se añadió a las muestras 5 µl de reacción TdT Buffer (Componente A), por 10 minutos a 37 °C, nuevamente se lavo y se añadió 2 µl de EdUTP (Componente B ), por 10 minutos a 37°C, se lavo, por último se le agrego 1 µl de TdT enzyme (Componenete C), por 10 minutos a 37°C y se lavo nuevamente. Después de esto se coloco BSA 3% y Triton X-100 al 0.1% en PBS por 5 minutos, se lavo con PBS inmediatamente se le añadió 10 µl de la reacción Click-it TUNEL, se incubo por 30 minutos a 37°C, protegiendo las muestras de la luz; posteriormente se removió la reacción y se le añadió BSA al 3 % en PBS por 5 minutos y por último se lavo con PBS. Finalmente, se le coloco a cada muestra 10 µl de solución Hoechst33342 y se lavaron las muestras con PBS y se observo en un microscopio invertido equipado con fluorescencia. Se capturaron las imágenes usando un sistema Zeiss Apotome 2 (Zeiss Axiobserver V2) y las imágenes se analizaron utilizando el software ZEN Black (Zeiss)

### **3.6 Determinación de la fragmentación del ADN a través de prueba COMETA**

La prueba cometa o electroforesis de célula única consistió en hacer un corrimiento electroforético de las células a analizar. En las células con fragmentación en el ADN fueron determinadas por la migración de fragmentos pequeño formando halos adoptando la forma de cola de cometas. La técnica

consistió en la colocación de una serie de tres geles de agarosa de bajo punto de fusión, en disposición horizontal, uno sobre el otro; en el primero se vertieron 200  $\mu$ l de gel de agarosa al 4%, en unos portaobjetos previamente lavados 10 minutos con acetona y etanol, secándolos cuidadosamente. Posteriormente, se formó el segundo gel vertiendo 750  $\mu$ l de gel de agarosa al 3% en un tubo eppendorf con la muestra de espermatozoides o núcleos aislados, para terminar vertiendo 100  $\mu$ l gel al 4%, todo esto teniendo en cuenta que los geles se dejaron enfriar en una cámara fría, cada uno antes de colocar el siguiente gel. Al tener esta disposición de los tres geles de agarosa en forma horizontal uno sobre el otro, se le dejaron hidratando en búfer de lisis suplementado con DL-Ditiotreitol 9 mM DTT (Sigma Chemical, Co.) por una hora. Después se lavó con Buffer Tris 1x, posteriormente se pasó a corrimiento electroforético 25 minutos a 40V, 300 mA, terminando con una tinción de naranja de acridina y se observó en un microscopio de fluorescencia utilizando filtro de excitación a 488nm.

#### **4. RESULTADOS**

En este trabajo con el fin de observar si el daño de fragmentación en el ADN de espermatozoides humanos difiere de sus núcleos aislados, se determinaron las concentraciones celulares y se realizaron dos pruebas, COMETA y TUNEL.

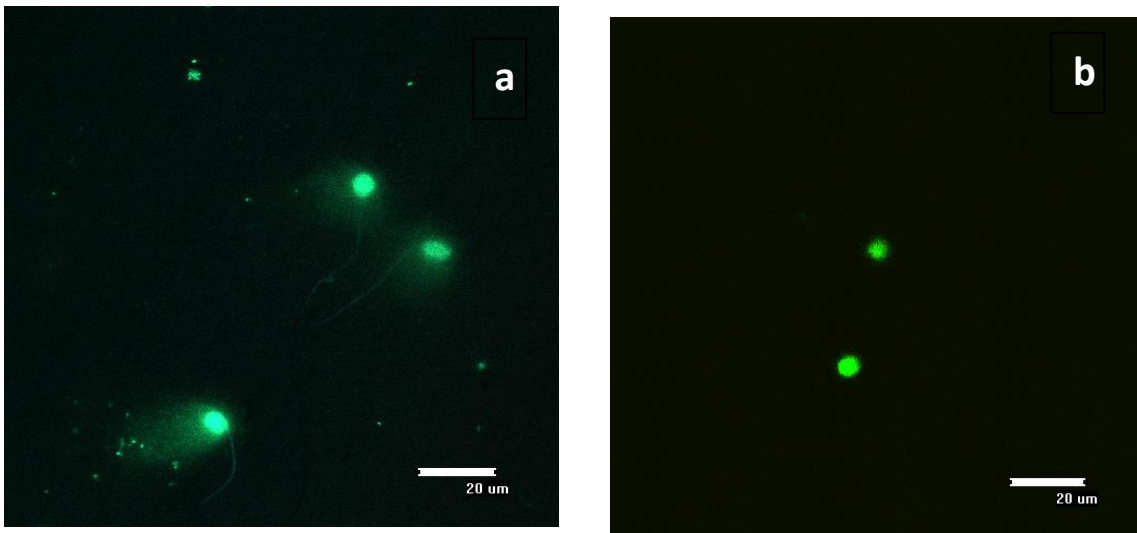
Los resultados obtenidos por espermatobioscopia de las muestras de humanos recién obtenidas fueron normales, dentro de los parámetros establecidos por la OMS. Sin embargo, se observó un alto porcentaje de células con fragmentación del ADN.



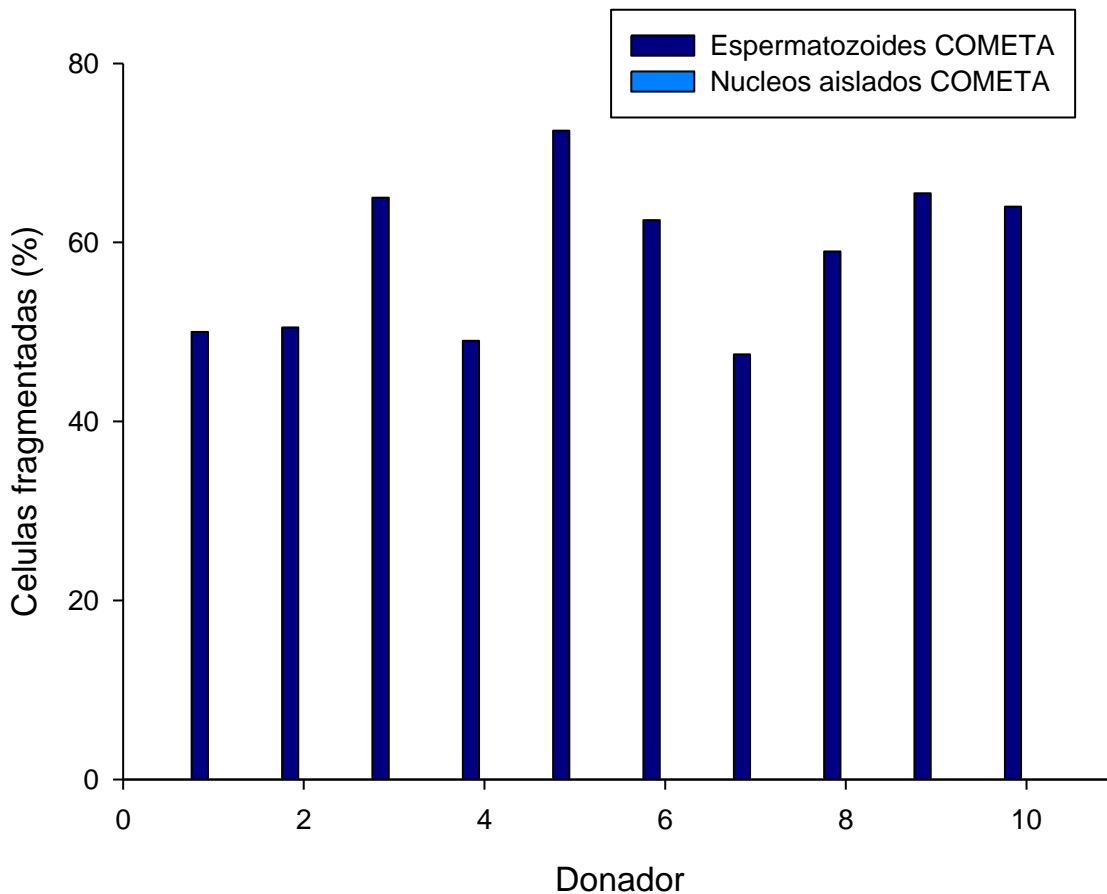
#### 4.1 Determinación de la fragmentación de espermatozoides y sus núcleos aislados a través de la prueba COMETA

Se incluyen espermatozoides en un microgel de agarosa y se someten a lisis, los núcleos desproteinizados se someten a electroforesis. El ADN fragmentado avanza por acción del campo eléctrico y se observó una imagen de “cometa” (Fig.1a).

En este trabajo se observó que la fragmentación de ADN en espermatozoides analizado por prueba COMETA, fue de 58.55 % (Grafica 1). Sin embargo, el tratamiento empleado para la obtención de núcleos aislados, eliminó a los núcleos que presentaron fragmentación ya que al ser analizados por prueba COMETA no se observó desplazamiento de las hebras de ADN en las células (Fig. 1).



**Fig 1: Microfotografías de fluorescencia que muestran espermatozoides que describen un cometa cuando presentan fragmentado su nucleo (a) y nucleos aislados de espermatozoides que describen la integridad del ADN cuando no presentan fragmentacion. Se puede observar una alta compactación de la cromatina y una gran estabilidad en los nucleos aislados, ya que mantienen una estructura redonda (b).**

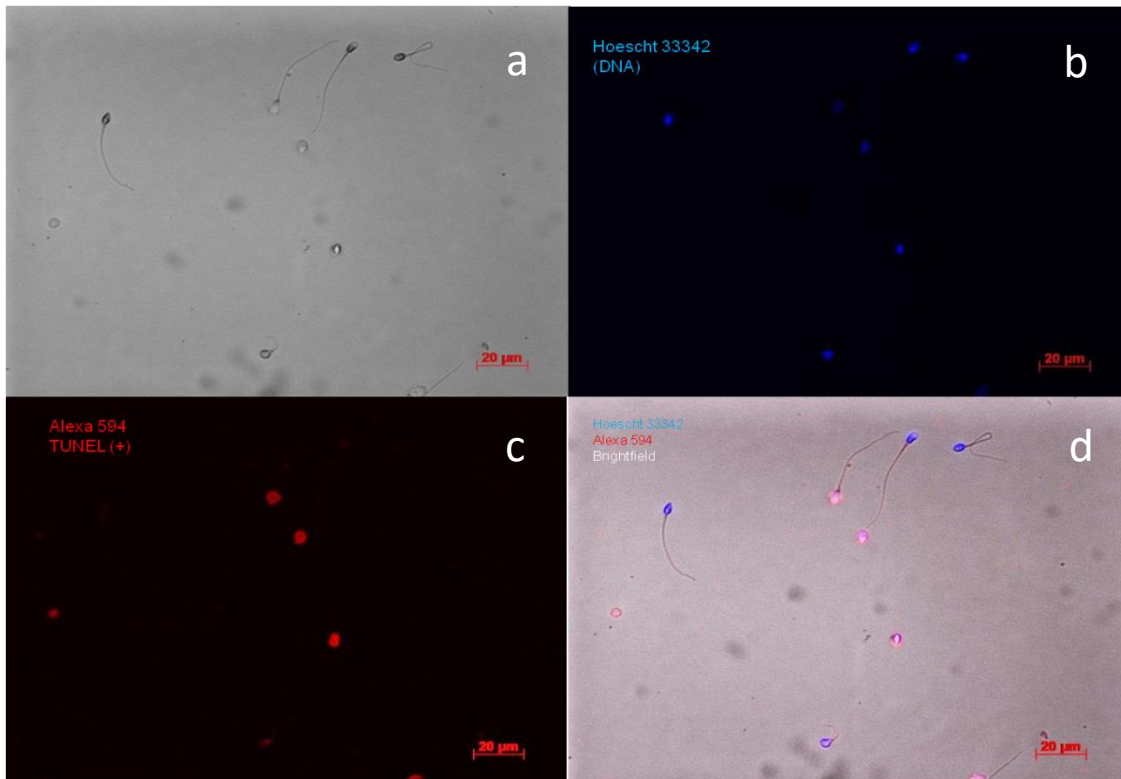


**Grafica 1.** Se representa un porcentaje de núcleos de espermatozoides fragmentados analizados por la prueba COMETA en cada uno de los pacientes estudiados.

#### **4.2 Determinación de la fragmentación de ADN en espermatozoides y sus núcleos aislados a través de la prueba TUNEL**

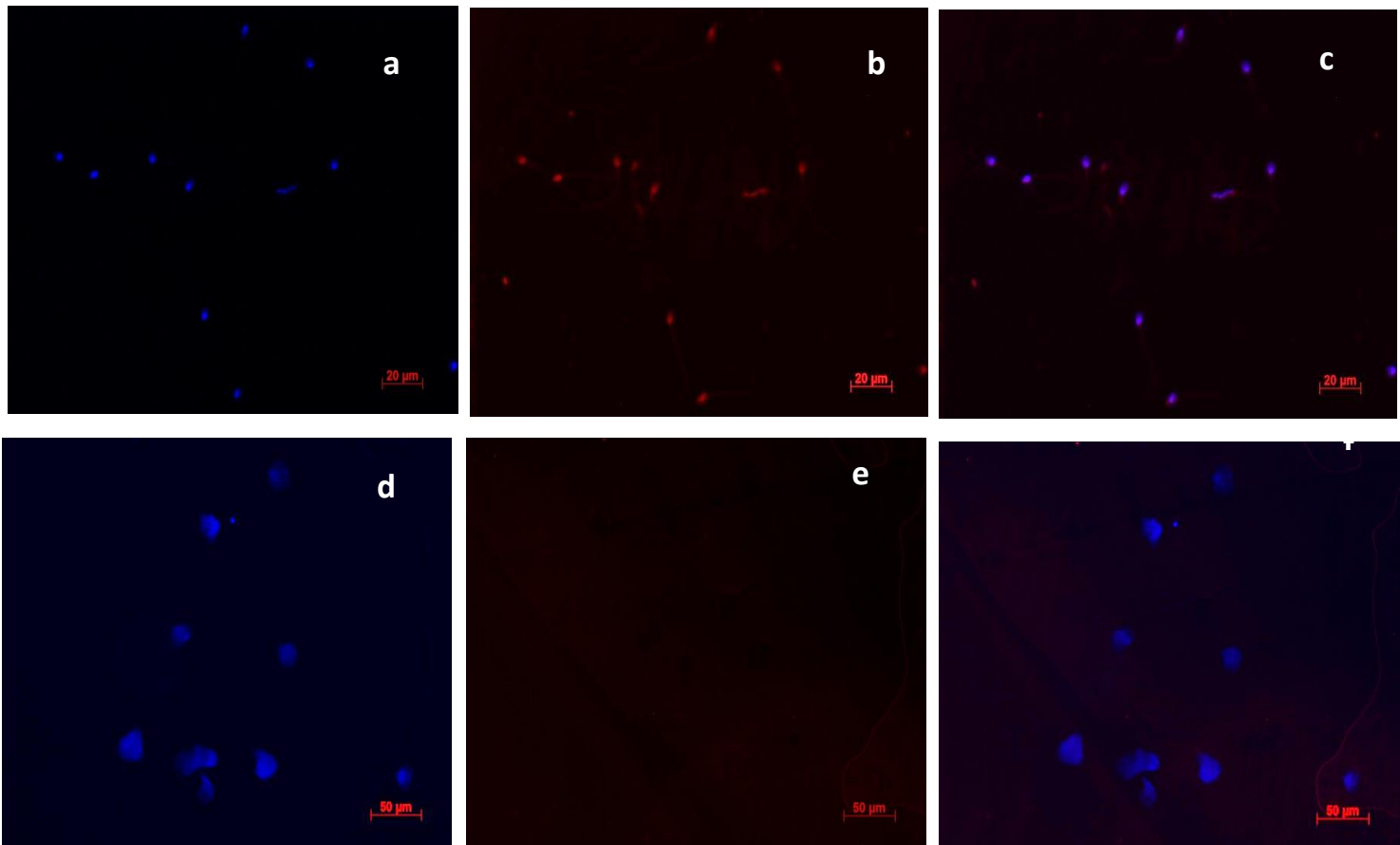
En esta prueba se observó, al igual que en la prueba COMETA, el grado de fragmentación de ADN en las muestras de espermatozoides humanos y sus núcleos aislados a través de la prueba TUNEL. Se observó que, en promedio, el

58.6% de los espermatozoides mostraron células con ADN fragmentado, sin embargo, en sus núcleos aislados no se logró encontrar fragmentación (Fig.3).



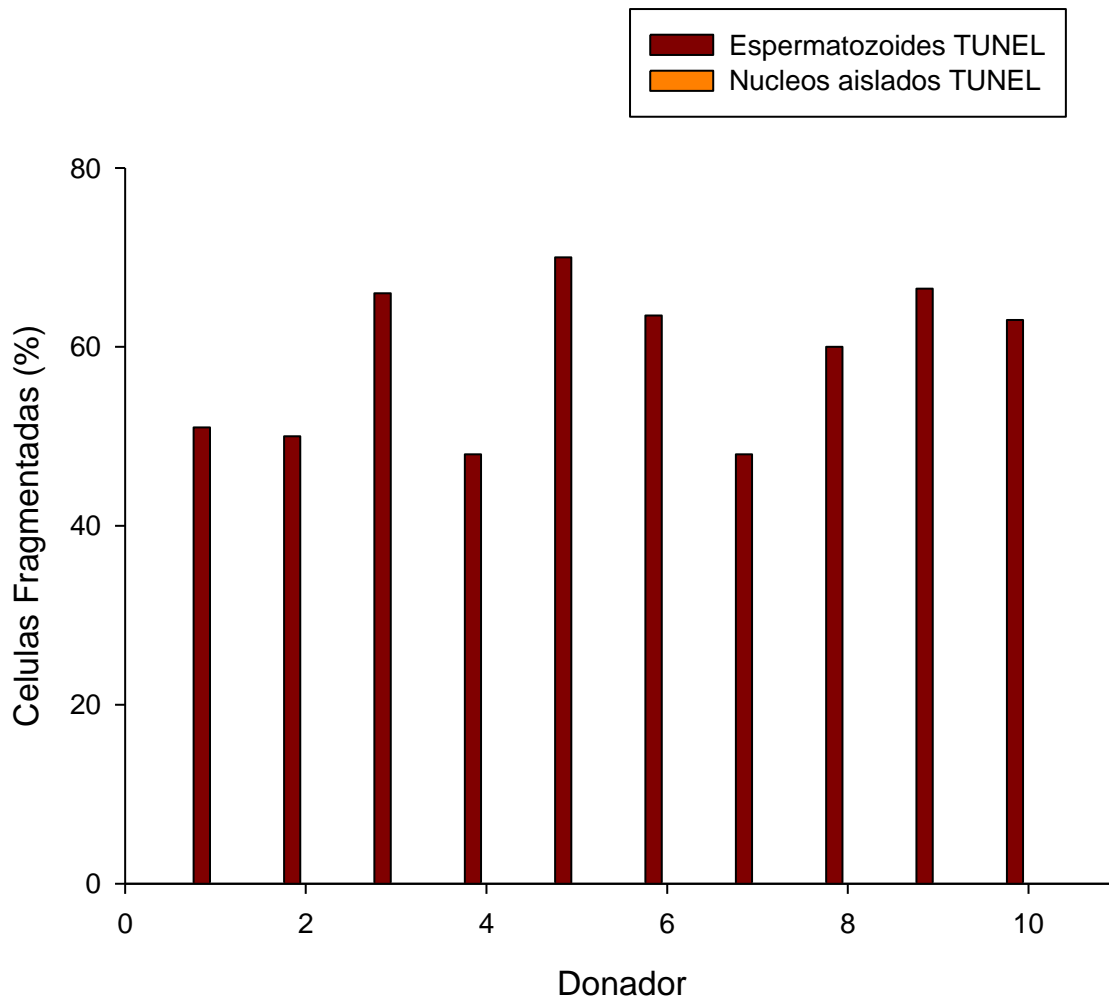
**Fig.2.** Espermatozoides humanos analizados por prueba TUNEL. Se puede observar la morfología normal de los espermatozoides al ser analizados por microscopia de contraste de fases (a) y así como el ADN al ser teñido con Hoescht33342 (b). Sin embargo, se observa que la mayoría presentan ADN fragmentado al ser TUNEL(+) (c, d).

Sin embargo, al eliminar las membranas celulares, se pudo observar que los núcleos aislados obtenidos no presentaron ADN fragmentado (Fig 3). Este fenómeno fue observado en todas las muestras analizadas.



**Fig.3. Espermatozoides por microfotografía de fluorescencia de espermatozoides humanos (a,b,c) y sus núcleos aislados (d,e,f) analizados por prueba TUNEL. Se observa el ADN teñido con Hoechst 33342 (a,d), y los núcleos con ADN fragmentados detectados por la fluorescencia de Alexa-fluor 594 (TUNEL+); b, c, e, f).**

Es importante hacer notar que el porcentaje de núcleos aislados con ADN fragmentado fue nulo para todas las muestras analizadas (Grafica 2).



**Grafica 2. Se representan millones por mililitro de espermatozoides núcleos aislados con fragmentación de ADN analizados por prueba TUNEL.**

### 4.3 Concentración celular de la muestra de espermatozoides humanos y sus núcleos aislados.

Al realizar la espermatobioscopia directa de cada muestra de espermatozoides se obtuvo la concentración celular de esta y de sus núcleos aislados con el fin de cuantificar las células. La concentración inicial de espermatozoides nos arrojó una mayor cantidad de células, en comparación con la de sus núcleos aislados obtenidos (Fig.6).

En la grafica (Fig.6) se logra ver como las concentraciones de células en espermatozoides humanos es mucho mayor que la concentración de células obtenida de núcleos aislados.

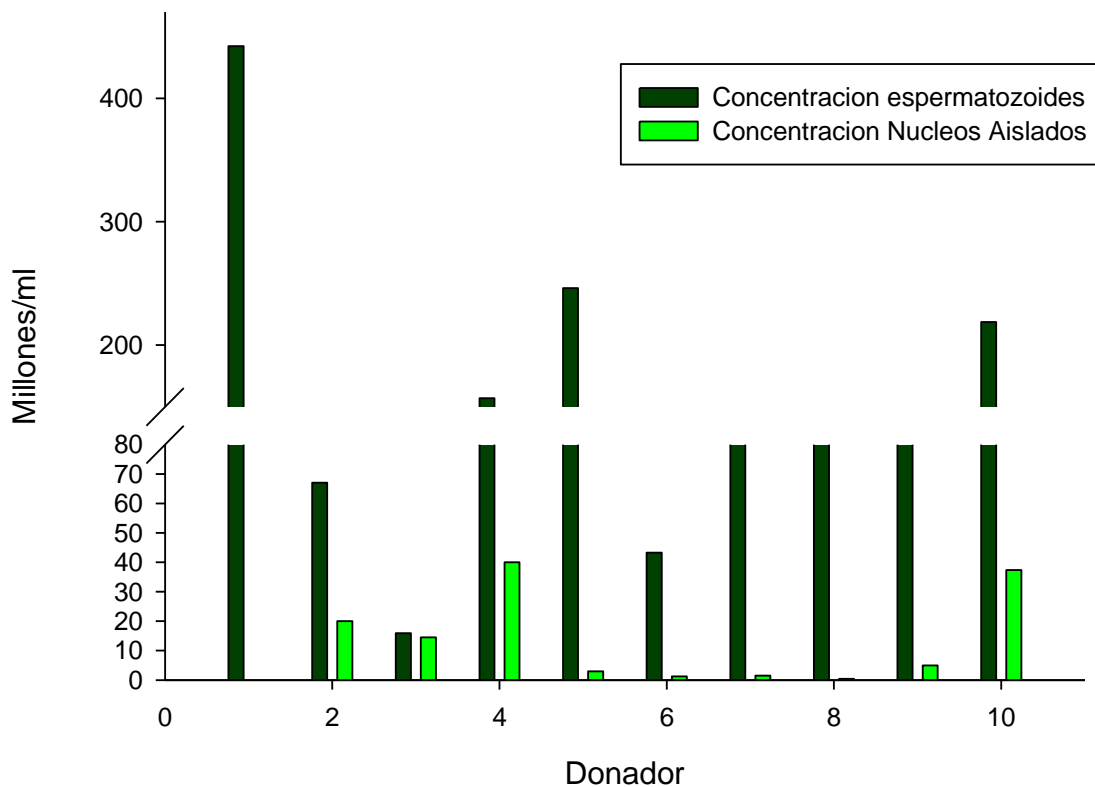
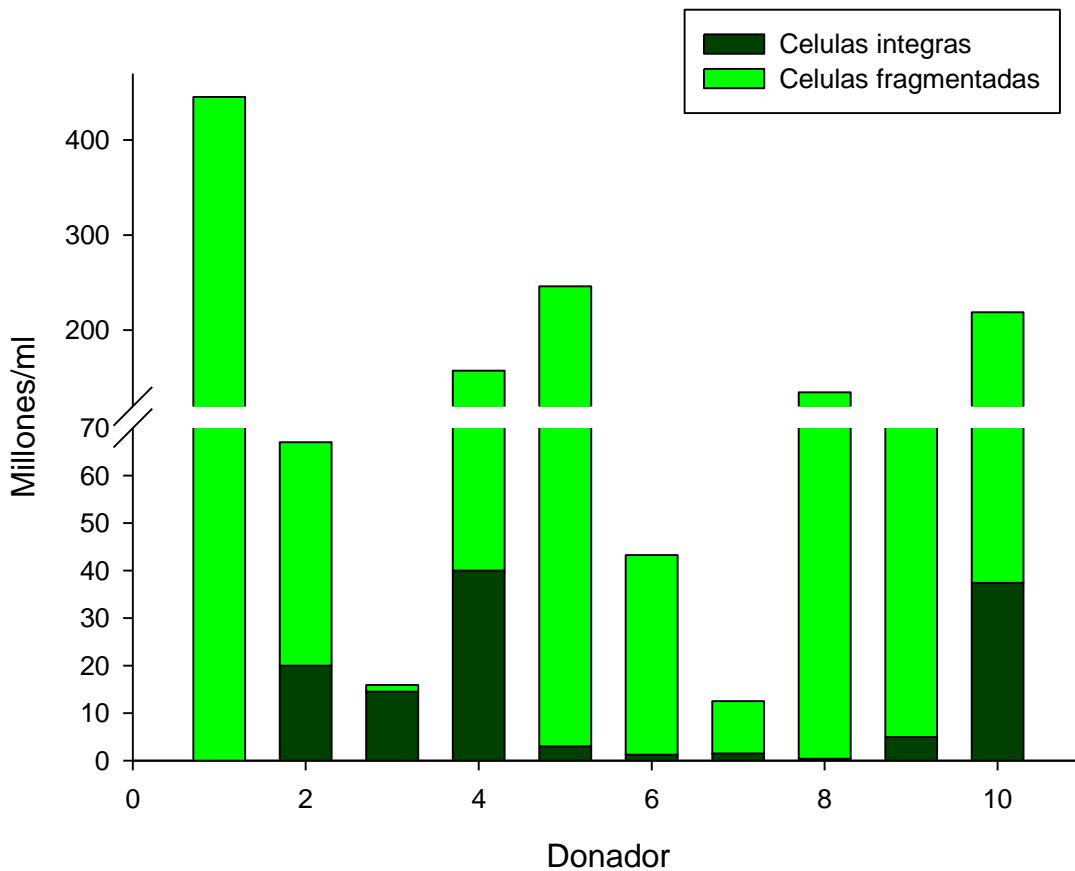


Fig. 6 Grafica de resultados de la concentración de espermatozoides humanos y sus núcleos aislados.

Como se ha mencionado antes, la obtención de núcleos aislados, elimina todas las células con fragmentación en el ADN, por lo tanto, como se observa en la grafica comparativa (Fig.7), se muestra el empalme de células integras contra células fragmentadas; las células integras son los núcleos aislados de espermatozoides humanos que se encontraron de cada muestra y las células fragmentadas son el número de células de espermatozoides eliminadas en la realización de la técnica de núcleos aislados.



**Fig.7 Grafica comparativa de la concentración de núcleos no fragmentados o integros y núcleos fragmentados, se logra observar que en la mayoría de las muestras, los resultados de la concentración de células fragmentadas sobresale en comparación, de las células no fragmentadas.**

En esta grafica se logra observar que, en la mayoría de las muestras, el resultado de las células fragmentadas de espermatozoides humanos sobresale en comparación de las células integra, pero también al empalmar estos dos resultados nos muestra la concentración inicial, lo que nos indica que los datos obtenidos de la cuantificación de células fragmentadas y no fragmentadas están correctos.

## **5. DISCUSIÓN**

Las muestras obtenidas y analizadas por espermatobioscopia directa de espermatozoides humanos, fueran normoespermicas dentro de los parámetros de la OMS, a pesar de esto; la integridad del ADN espermático de las muestras de semen analizadas, se encontraron con un alto índice de fragmentación del ADN, por lo que esto nos dice, que la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos no es exclusiva de las personas con problemas de infertilidad. Además, esto nos podría sugerir que las fallas de implantación y abortos por causa desconocida, puede ser debido a la fragmentación del ADN en espermatozoides, como ha sido propuesto por diversos trabajos (Silvia y Gadella, 2006; Agarwal y Alamaneni, 2005; O´Brien y Zini, 2005).

Las muestras de semen obtenidas de los donadores fueron analizadas por espermatobioscopia directa obteniendo la concentración total, que en este caso, sería la concentración inicial de la muestra; después del tratamiento para la obtención de núcleos aislados, se analizo la concentración total de núcleos obtenidos y se pudo observar que la cantidad de núcleos fue menor en comparación con la concentración inicial de la muestra. Al analizar la integridad del ADN de los núcleos obtenidos, por prueba COMETA y TUNEL, se observo que los núcleos no presentaban fragmentación en su ADN, por lo tanto, esto no sugiere que los espermatozoides con fragmentación en su ADN pueden ser eliminados al ser tratados para la obtención de núcleos aislados.



En diversos trabajos se ha mostrado que una causa de infertilidad masculina es proveniente de la calidad del ADN del núcleo del espermatozoide maduro, en más del 20% de los casos de infertilidad masculina es a causa de la integración del ADN espermático (Agarwal y Said, 2003).

Las técnicas que se utilizan en la actualidad para la determinación de la infertilidad en varones, solo dan a conocer la calidad del semen e indican la posibilidad que tienen los espermatozoides de encontrarse con el ovulo, sin embargo, todas estas técnicas practicadas en la actualidad, en las diferentes clínicas y hospitales de reproducción, no aportan información sobre la calidad del ADN espermático (Perez-Llano *et al.*, 2010). Por lo tanto es recomendable que se agreguen nuevas técnicas para la determinación de la calidad de ADN, como parte del procedimiento de la espermatozoscopia directa y así asegurar una mejor muestra para aplicar a los diferentes procesos de reproducción asistida.

Este trabajo demostró que la metodología para la obtención de Núcleos Aislados permite eliminar espermatozoides humanos con fragmentación de ADN. Los núcleos aislados, estructuras de ADN y matriz nuclear altamente compactadas obtenidas de la eliminación de las membranas celulares por tratamientos químicos, tales como DTT y CTAB; el DTT es un compuesto capaz de reducir los enlaces disulfuro de las proteínas a grupos sulfhidros, esto permiten desplegar completamente una proteína y separar las subunidades de una proteína; el CTAB es un detergente catiónico que tiene la propiedad de precipitar ácidos nucleicos y polisacáridos, por esta razón, estas dos sustancias son útiles para la remoción de las membranas de los espermatozoides; en el caso del DTT al poder separar las subunidades de una proteína, lograrían entrar sustancias externas, en este caso, CTAB, que por su propiedad de detergente, entraría en el núcleo y si el ADN no muestra una alta compactación de la cromatina y una gran estabilidad, terminaría por dañar la estructura del ADN. En este estudio se observó que los Núcleos Aislados no muestran fragmentación de ADN, como fue observado por técnicas moleculares, tales como COMETA y TUNEL. Estas técnicas, a pesar de ser herramientas confiables para determinar la integridad del ADN de

espermatozoides, requieren de equipos sofisticados que no se encuentran al alcance de toda la gente, por lo tanto, el desarrollo de nuevas metodologías, como la usada para la obtención de Núcleos Aislados, puede ser factible por su bajo costo y mínima complejidad para la determinación de espermatozoides con fragmentación de ADN.

La fragmentación del ADN en el espermatozoide que fecunda un óvulo puede tener un impacto drástico en la ontogenia y, más tarde en la salud de la descendencia. Evenson (2002) mostró una relación significativa entre la fragmentación del ADN humano en el esperma de toro y la pérdida de potencial de fertilidad. La detección de daños en el ADN espermático puede ayudar a identificar la capacidad reducida de espermatozoides humanos para fertilizar óvulos o para iniciar un embarazo saludable. Sin embargo, las técnicas actuales para el análisis de la integridad del ADN son extremadamente sofisticadas, laboriosas y caras por la cantidad de reactivos y equipos sofisticados. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas metodologías, como la empleada para la obtención de núcleos aislados, por su bajo costo y complejidad, puede ser la metodología ideal para la detección de fragmentación en el ADN de espermatozoides. Además, es una metodología mucho más accesible, en comparación de técnicas como TUNEL, también en una técnica rápida y sencilla, en comparación de la prueba COMETA, ya que esta a pesar de que su metodología no es tan costosa como otras ya utilizadas, la realización de tal, lleva a necesitar de tiempo y habilidad por parte de la persona que la esté realizando.

El uso de nuevas técnicas a sido impulsado en gran parte por la aparición de la tecnología de la reproducción asistida en animales y humanos, pero la parte económica en todo esto, se a incrementado en lugar de disminuir. Además, recientes investigaciones han mostrado que el uso de metodologías de reproducción asistida no han cubierto las expectativas esperadas, ya que los niños y animales obtenidos por este tipo de técnicas han presentado algún tipo de alteración en su condición de salud.

La obtención de núcleos aislados, de espermatozoides humanos, nos permite eliminar las células con poca integridad de ADN en el núcleo de los espermatozoides y poder determinar el porcentaje de células, de una muestra espermática, que presentan fragmentación de ADN. Esta técnica nos proporciona un forma más practica y segura para la determinación de la calidad de ADN, por lo tanto, puede ser utilizada como un parámetro más de medición, dentro de la espermatobioscopia directa para la determinación de la calidad espermática en varones y tener una información más completa del individuo, en las clínicas de reproducción.

## **6. CONCLUSIÓN**

Concluimos que la metodología para la obtención de Núcleos Aislados de espermatozoides humanos, puede eliminar las células con fragmentación de ADN y puede ser utilizada como una herramienta para determinar el porcentaje de células con fragmentación de ADN en una muestra espermática.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

**Agarwal, A.** y S.S.R.Allamaneni. 2005. Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Revista Internacional de Andrología*. 3: 31-37.

**Aitken, R.J.** y A.J. Koppers. 2011. Apoptosis and DNA damage in humans spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*.13:36-42.

**Agarwal, A.** y S.S. Allamaneni. 2004. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol*. 5: 51- 56.

**Agarwal, A.** y S.S.R. Allamaneni. 1998. Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. 2:20-28.

**Agarwal, A.** y T.M. Said. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human reproduction update*. 9: 331-345.

**Balhorn, R., S.,** Reed, y N. Tanphaichitr. 1974. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of.11: 61-69.

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

**Cho, C.,** W.D. Willis, E.H. Goulding, H. Jung-Ha, Y.C. Choi, N.B. Hecht, y E.M. Eddy. 2001. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet*. 28:82-86.

**Daniluk, J.** 2001. If we had it do over again... Couples reflections on their experiences of infertility treatments. *Family Journal: counseling and Therapy for Couples and Families*. 9: 122-133.

**Dunkel-Schetter, C.** y M. Lobel. 1991. Psychological reactions to infertility. En Stanton, A.L. y Dunkel-Schetter, C. (Eds.), *Infertility: Perspectives from Stress and Coping Research* (pp.29-57). New York: Plenum Press.

**Evenson, D.P.**, K.L. Larson, y L.K. Jost. 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with the other techniques. *J Androl.*23: 25-43.

**Foresta, C.**, M. Zorzi, M. Rossato, y A. Varotto. 1992. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int. J. Androl.* 15: 330-337.

**Forrest, L.** y M.S. Gilbert. 1992. Infertility: An unanticipated and prolonged life crisis. *Journal of Mental Health Counseling.* 14, 42-58.

**Gibson, M.** y A.O. Ahmad. 2013. Male infertility. In: *Clinical Reproductive Medicine and Surgery. A Practical Guide* (Edited by T. Falcone y W.W. Hurd). Springer New York. PP.163-175.

**Graham, J.K.**, E. Kunze, y R.H. Hammerstedt. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction.* 43:55-64.

**Henkel, R.**, E. Kierspel, M. Hajimohammad, T. Staf, C. Hoogendijk, C. Mehnert, R. Menkveld, W.B. Schill, y T.F. Kruger. 2003. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online.* 7:477-484.

**Hermo, L.**, R.M. Pelletier, D.G. Cyr, y C.E. Smith. 2010. Surfing the wave, cycle, life history and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique.* 73: 243–278.

**Kramer, J.A.** y S.A. Krawetz. 1997. RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Mol. Hum. Reprod.* 271: 11619-11622.

**Leduc, F.**, V. Maquennehan, G.B. Nkoma, y G. Boissonneault. 2008. DNA Damage Response During Chromatin Remodeling in Elongating Spermatids of Mice. *Biology of Reproduction.* 78(2): 324-332.

**Moustafa, M.H.**, R.K. Sharma, J. Thornton, E. Mascha, M.A. Abdel Hafez, A.J. Thomas, y A. Agarwal. 2004. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA desnaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*. 19(1): 129-138.

**Moreno-Rosset, C.** 2004. La Psicología de la Reproducción: Una Subdisciplina de la Psicología de la Salud. ASEBIR. Asociación para el estudio de la biología de la reproducción. 9(2)6-8.

**OMS.** 1999. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Pérez- Llano, B.**, C. Lopez-Hernandez, P. Garcia- Casado, F. Arroyo, A. Gosalbez, R. Sala, y J. Gosalbez. 2010. Dynamics of sperm DNA fragmentation in the swine: Ejaculate and temperature effect. *Animal reproduction Science*. 119(3-4): 235-243.

**Sakkas, D.**, O. Moffat, G.C. Manicardi, E. Mariethoz, N. Tarozzi, y D. Bizarro. 2006. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the posible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*.66: 1061-1067.

**Silvia, P.F.N.** y B.M. Gadella. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 65 (5): 958-978.

**Tanphaichitr, N.**, P.Sobhon, N. Taluppeth, y P. Chalermisarachai. 1978. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp. Cell*.

**Valentine, D.P.** 1986. Psychological impact of infertility: Identifying issues and needs. *Social Work in Health Care*. 11: 61-69.

**Yu, Y.E.**, Y. Zhang, E. Unni, C.R. Shirley, J.M. Deng, L.D. Russell, M.M. Weil, R.R. Begringer, y M.L. Meistrich. 1997. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility

in translation nuclear protein 1- deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 4683-4688.

**Zhao, M.**, C.R. Shirley, Y.E. Yu, B. Mohapatra, Y. Zhang, E. Unni, J.M. Deng, N.A. Arango, N.H.A. Terry, M.M. Weil, L.D. Russell, R.R. Behringer, y M.L. Meistrich. 2001. Targeted disruption of the translation protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. Mol Cell Biol. 21: 7243-7255.