

# Fragmentación del ADN espermático en espermogramas normales

## *Spermatic DNA fragmentation on normal spermograms*

Frattini, Gustavo\*; Andreoli, Gabriela\*\*; Pené, Alicia\*\*

\* Clínica Privada Pueyrredón, Mar del Plata/Centro especializado en reproducción CRECER.

\*\* Centro especializado en reproducción CRECER, Mar del Plata.

**Objetivo:** Evaluar la incidencia de fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) espermático en espermogramas normales.

**Materiales y métodos:** Se realizó un análisis prospectivo de todas las muestras de semen ingresadas en un laboratorio de fertilidad en un período de 60 días. Los espermogramas se procesaron con la técnica convencional y a todos se les realizó un Test de Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) para evaluar el porcentaje de daño en el ADN de los espermatozoides. Para los propósitos de este estudio, se estableció un valor de corte normal inferior al 20% para la positividad del Test de TUNEL.

**Resultados:** En el período analizado se estudiaron 92 muestras, 21 de semen normal y 71 anormales. La tasa promedio de fragmentación del ADN fue del 15,28% en las muestras normales y del 18,57% en las muestras de semen con alguna anomalía (p: 0,219). Dentro del grupo con semen normal, el 23,8% (5 casos) presentó valores del Test de TUNEL superiores al 20%, mientras que este porcentaje fue del 35,2% (25 casos) en el grupo con espermograma anormal (p: 0,327).

**Conclusiones:** Los pacientes con infertilidad de pareja y espermograma normal presentan una alta tasa de fragmentación del ADN espermático. Este porcentaje no muestra diferencias estadísticas con el grupo de hombres infértiles y espermograma anormal. La alta tasa de fragmentación del ADN observada debería ser tenida en cuenta al estudiar pacientes con esterilidad sin causa aparente (ESCA).

**PALABRAS CLAVE:** Fragmentación del ADN, Test de TUNEL, semen, esterilidad sin causa aparente.

**Objective:** To assess the incidence of spermatic DNA fragmentation in normal spermograms.

**Materials and methods:** A prospective analysis of all semen samples was performed in a fertility laboratory within a 60 day period. The spermograms were processed using the conventional technique. In order to evaluate the percentage of damage in spermatozooids DNA, the spermograms were tested according to the TUNEL Test. For purposes of this research, a normal cut-off point lower than 20% was established for the test positivity.

**Results:** During the aforementioned period, 21 normal and 71 abnormal semen samples (92 total samples) were studied. The average rate of DNA fragmentation was 15.28% for the normal samples and 18.57% for the abnormal ones (p: 0.219). Within the former group, 5 cases (23.8%) presented TUNEL Test results higher than 20%, whereas within the latter group, 25 cases (35.2%) presented such results (p: 0.327).

**Conclusions:** Patients with infertility on the couple and normal spermograms have a higher rate of spermatic DNA fragmentation. This percentage does not show statistical differences with the group of infertile men with abnormal spermograms. The high rate of DNA fragmentation should be taken into account when studying patients with unexplained infertility.

**KEY WORDS:** DNA fragmentation, TUNEL Test, semen, unexplained infertility.

Se estima que el 90% de las parejas en edad reproductiva consiguen un embarazo en el primer año de búsqueda sin método anticonceptivo y con relaciones sexuales frecuentes<sup>1,2</sup>. El grupo restante lo constituyen las parejas infértiles.

Luego de una completa evaluación de estas parejas con dificultades para concebir, se encuentra que en el 10 al 15% de ellas no existe un motivo aparente que explique su infertilidad. Este grupo es denominado habitualmente como: "Esterilidad Sin Causa Aparente (ESCA)"<sup>1,3</sup>.

Los hombres del grupo con ESCA presentan espermogramas dentro del rango normal.

Numerosos autores han demostrado que los parámetros convencionales del espermograma (motilidad, morfología y concentración) se hallan vinculados con la integridad del ADN del espermatozoide.

Irvine, Zinni y Sakkas confirmaron una correlación negativa entre la calidad del semen y el daño en el ADN<sup>4,5,6</sup>.

El daño del ADN espermático tiene múltiples causas, y puede ser detectado con una técnica de inmunofluorescencia denominada TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling)<sup>4-9</sup>.

El ADN espermático está organizado de forma tal que mantiene la cromatina compacta y estable. El espermatozoide fértil tiene un ADN estable, el cual es capaz de descondensarse en el momento apropiado del proceso de la fertilización transmitiendo así un ADN sin defectos al futuro embrión<sup>10,11,12</sup>.

Sin embargo, a pesar de esta correlación positiva aparente entre los parámetros seminales y la integridad del ADN espermático, parecería que el espermograma convencional no es del todo útil como único método de evaluación en los pacientes con ESCA.

Es por este motivo que continúan desarrollándose técnicas diagnósticas con el objetivo de evaluar las causas de la imposibilidad para concebir en este grupo.

## OBJETIVO

El propósito del presente estudio es el de establecer si es posible la existencia de daño en el ADN espermático aún en espermogramas considerados normales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron en forma prospectiva todas las muestras de espermograma ingresadas a un laboratorio de análisis clínicos, especializado en reproducción durante el período agosto–octubre de 2009 (60 días).

Se registró la edad de los pacientes, y todas las muestras fueron procesadas dentro de los 30 minutos luego de su recolección en un frasco estéril, obtenidas por masturbación y teniendo una abstinencia sexual de 3 a 7 días.

En todas se consideraron: aspecto, volumen, viscosidad, pH, licuefacción, concentración, motilidad, vitalidad, presencia de células redondas y morfología.

La concentración fue establecida a 37 grados en cámaras de Makler o de Horwell.

Para determinar la motilidad espermática fueron evaluados sistemáticamente en dichas cámaras por lo menos cinco campos microscópicos, para clasificar 200 espermatozoides. La motilidad de cada espermatozoide fue clasificada como "a" (G3), "b" (G2), "c" (G1) y "d" (G0), de acuerdo a si muestra:

- a. motilidad progresiva rápida (e.j.,  $\geq 25 \mu\text{m/s}$  a  $37^\circ\text{C}$  y  $>20 \mu\text{m/s}$  a  $20^\circ\text{C}$ ; nótese que  $25 \mu\text{m}$  es aproximadamente igual a la longitud de cinco cabezas o de media cola); denominados también G3
- b. motilidad progresiva lenta; denominados también G2
- c. motilidad no progresiva ( $<5 \mu\text{m/s}$ )
- d. inmóviles.

El recuento de células redondas fue realizado en la misma cámara.

Para el análisis de vitalidad se realizó una tinción de la muestra con eosina, contándose 200 espermatozoides con el microscopio óptico, y diferenciando a aquellos que están vivos (no coloreados) de las células muertas (coloreadas con eosina).

Para el análisis morfológico, los extendidos de semen fueron coloreados y los espermatozoides evaluados según el criterio estricto de Kruger<sup>13</sup>.

### Valores normales de las muestras:

Los criterios de normalidad fueron establecidos de acuerdo a las recomendaciones del manual de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud para el examen del semen humano y la interacción del semen y el moco cervical<sup>14</sup> (apéndice Ia). A continuación se detallan los aspectos más importantes evaluados en cada muestra.

- *Volumen:* 2 ml o más.
- *Concentración:* mayor o igual a 20 millones de espermatozoides por ml.
- *Motilidad:* mayor o igual al 50% con progresión lineal dentro de los 60 minutos de eyaculado, con motilidad G3 25% o mayor.
- *Leucocitos:* menor o igual a 1 millón por ml.
- *Morfología (según criterio estricto de Kruger):* mayor o igual a 15% de formas normales.

### Test de TUNEL:

A todas las muestras de semen ingresadas en el laboratorio durante el período descrito se les realizó un Test de TUNEL utilizando el: "In situ cell death detection Kit, fluorescein" de laboratorios Roche, siendo analizadas bajo microscopia de fluorescencia.

El procesamiento de las muestras se realizó sobre semen fresco.

La desoxinucleotidil Transferasa Terminal (TdT) es una polimerasa que cataliza la síntesis de poli-desoxirribonucleótidos de nucleótidos trifosfato. Esta polimerasa no puede iniciar por sí sola una nueva cadena polimérica y por tanto requiere de un Primer (iniciador) con un extremo 3'OH Terminal.

A diferencia de las verdaderas ADN polimerasas, la TdT no requiere de un templado (molde) y, por lo tanto, la incorporación de nucleótidos se produce al azar. El producto de la polimerización, por consiguiente, refleja la incorporación en la cadena de ADN dañado de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) utilizados como sustrato.

El fundamento de la técnica TUNEL se basa en la incorporación de desoxiuracilotrifosfato (dUTP), como único desoxinucleótido presente en el buffer de reacción; dicho dUTP se encuentra marcado con fluoresceína. De esta manera, la presencia de simples y/o dobles rupturas del ADN (fragmentación del ADN) es detectada y cuantificada mediante Microscopia de Fluorescencia ya que el dUTP marcado es incorporado en las cadenas de ADN dañado.

El Test de TUNEL detecta, entonces, extremos de ADN libres (NICKS) por incorporación enzimática

en los mismos de nucleótidos marcados.

La técnica fue descrita inicialmente para la detección de rupturas simples y/o dobles en el ADN de células apoptóticas<sup>15</sup>.

**Valores normales del Test de TUNEL:** Si bien aún no está establecido el valor de corte normal para este Test, para el propósito de este estudio se consideraron positivas (o anormales) a aquellas muestras de semen con más del 20% de células marcadas. Dicho valor de corte se estableció teniendo en cuenta estudios como los de Benchaib, Henkel, Evenson y Spano<sup>16-19</sup>. Un valor adicional de corte del 30% fue también utilizado para comparar los grupos de semen normal y anormal y establecer sus diferencias.

### Análisis estadístico:

El análisis estadístico de este grupo fue realizado con el programa Stats Direct statistical software versión 2.7.5 (14/7/2009), y para la comparación de los datos fueron utilizados el Chi-square Test, el Test exacto de Fisher de 2 colas y el Mann-Whitney U test two sided.

## RESULTADOS

Durante el período mencionado (agosto-octubre de 2009) fueron evaluadas 92 muestras de semen ingresadas en el laboratorio de fertilidad.

La edad promedio de los pacientes fue de 34 años (rango: 20–51 años).

De acuerdo a los criterios anteriormente descritos para la evaluación del espermograma, 71 muestras presentaron 1 o más parámetros seminales anormales (GRUPO SEMEN ANORMAL), mientras que 21 de los casos cumplieron con todos los parámetros de normalidad detallados en materiales y métodos (GRUPO SEMEN NORMAL).

El promedio de positividad del Test de TUNEL en el grupo con semen normal fue de 15,28% con un desvío estándar de 8,1 (mediana: 15). Dicho promedio en el grupo con semen anormal fue de 18,57% con un desvío estándar de 9,9 (mediana: 17). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los porcentajes de positividad del Test de TUNEL entre ambos grupos (p: 0,219). (**Figura 1**)

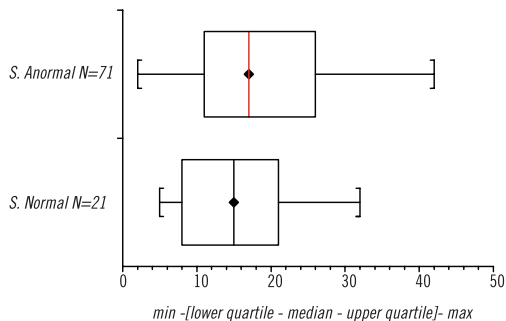


Figura 1. Porcentaje de Test de TUNEL en Semen Normal y Anormal.

#### Mann-Whitney U test

Observations (x) in Normal = 21 median = 15 rank sum = 844

Observations (y) in Anormal = 71 median = 17

U = 613 U' = 878

Exact probability (adjusted forties):

Lower side P = 0,1099 ( $H_1$ : x tends to be less than y)

Upper side P = 0,8901 ( $H_1$ : x tends to be greater than y)

Two sided P = 0,2199 ( $H_1$ : x tends to be distributed differently to y)

95.1% confidence interval for difference between medians or means:

K = 535 median difference = -3

CI = -8 to 2

La **Tabla 1** muestra la distribución de los casos con parámetros seminales normales y anormales, y los porcentajes de TUNEL positivo (mayor del 20% o mayor del 30%) hallados en cada grupo.

	SEMEN NORMAL	SEMEN ANORMAL
NÚMERO TOTAL DE CASOS	21	71
TEST DE TUNEL NEGATIVO	16	46
CASOS CON TEST DE TUNEL POSITIVO MAYOR DE 20%	5	25
%	23,8 %	35,20%
Valor de p	0,327	
CASOS CON TEST DE TUNEL POSITIVO MAYOR DE 30%	1	11
%	4,76%	15,49%
Valor de p	0,28	

Tabla 1.

En el grupo con semen normal, 5 de los 21 casos presentaron fragmentación del ADN espermático con valores superiores al 20% (23,8%), mientras que en el grupo con semen anormal 25 de los 71 casos (35,2%) presentaron valores superiores al punto de corte establecido en 20%.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos grupos con relación a la positividad del Test de TUNEL, tanto para el valor de corte de 20% como para el valor de corte de 30% (p: 0,327 para 20% y p: 0,28 para 30%).

La **Tabla 2** muestra un detalle del grupo con parámetros seminales normales y el porcentaje de células positivas para el Test de TUNEL hallado en cada caso.

Nótese que en todos los casos con porcentaje del Test de TUNEL superior al 20%, el porcentual de células positivas para el test de eosina fue siempre inferior al hallado en el Test de TUNEL.

#### DISCUSIÓN

De la práctica clínica y de numerosos datos obtenidos de la literatura se infiere que los parámetros seminales como la concentración, motilidad y morfología, que comúnmente son utilizados para clasificar a los hombres como fértiles, subfértiles e infértiles, no son, ninguno de ellos, diagnósticos por sí mismos de infertilidad<sup>18,20</sup>.

En la opinión de Evenson, la calidad del espermatozoide definida por los criterios de la OMS es un modesto predictor de los resultados reproductivos<sup>18</sup>.

Considerando estos hechos, y observando la situación desde otro punto de vista, podríamos suponer que existen otros factores que pueden determinar la fertilidad masculina y que se hallan ocultos al simple examen óptico inicial.

Si bien numerosos estudios han hallado buena correlación entre el daño en el ADN espermático y los parámetros seminales<sup>4,5,6</sup>, autores como Mehoni y Niederberger han hallado resultados contrarios<sup>21,22</sup>.

Asumiendo esto, habría razones para suponer que las muestras de semen normales en los pacientes con ESCA podrían contener anomalías determinantes para la falta de concepción.

Una excesiva tasa de fragmentación del ADN espermático podría ser una de esas causas.

Evenson, Larson y Spano han demostrado que el daño en el ADN espermático se correlaciona bien con la disminución de la fertilidad luego del coito o con técnicas de reproducción asistida, por lo que es posible pensar que cualquier alteración en el ADN espermá-

PACIENTE	CONCENTRACIÓN (MILLONES)	G3	G2	MORFOLOGÍA DE KRUGER	TEST DE EOSINA (+)	% TUNEL
1	130	44	18	16	8	17
2	177	49	18	17	9	5
3	92	72	12	21	4	10
4	195	55	24	18	5	14
5	480	31	21	17	12	17
6	418	38	17	16	11	<b>29</b>
7	156	48	24	19	6	<b>22</b>
8	33	29	36	17	11	<b>32</b>
9	210	30	21	17	12	16
10	265	34	20	17	8	20
11	205	29	10	15	9	17
12	405	38	17	19	9	13
13	387	50	18	18	8	7
14	220	25	23	18	9	<b>29</b>
15	510	54	14	19	8	5
16	92	30	31	19	9	6
17	92	36	27	18	9	9
18	360	35	18	14	13	7
19	386	31	21	17	12	<b>22</b>
20	115	26	17	14	16	15
21	242	38	18	17	9	9

**Tabla 2.** Pacientes con espermograma normal.

tico podría determinar una disminución en la tasa de embarazos<sup>18,19,23,24</sup>.

Una revisión publicada recientemente por un grupo de expertos concluye que la falta de estudios con suficiente número de casos impide tener valores de corte normales para el Test de TUNEL<sup>24</sup>.

Los valores de corte establecidos para este estudio fueron tomados en base a los hallazgos de estudios como los de Benchaib, Henkel, Evenson y Spano<sup>16-19</sup>.

Benchaib y cols. evaluaron los espermogramas de 54 intentos de ICSI, proponen un valor de corte de 18% y hallaron ausencia de fertilización cuando la tasa de fragmentación del ADN superaba el 30% de la muestra<sup>16</sup>.

Henkel y cols. proponen un valor de corte normal que ronda el 24%<sup>17</sup>.

En el estudio de Evenson y cols. se incluyó a 200 parejas que buscaban embarazo. Se detectó que la dificultad para concebir se daba en varones que presentaban lesiones en el ADN  $\geq 30\%$ , mientras que en el estudio realizado por Spano y cols. se evidenció que cuando el daño en el ADN es  $>20\%$ , se observa una disminución de la fertilidad. Según estos autores, cuando el grado de lesión en el ADN sobrepasa el 40%, la probabilidad de conseguir un embarazo es mínima<sup>18,19</sup>.

Las tasas de daño en el ADN espermático, halladas en el presente estudio, fueron similares a las reportadas por otros autores, tanto para el grupo con semen normal como para el semen anormal<sup>4,9,25,26</sup>.

Carrell, Varghese y Sergerie analizaron muestras de semen con fertilidad comprobada en donantes de semen con fertilidad comprobada y hallaron fragmen-

tación del ADN en el 11,95 (TUNEL), 11% (naranja de acridina) y 13,18% (TUNEL) respectivamente<sup>6,26,27</sup>.

Estos valores, que rondan el 12%, son más bajos que el promedio hallado en la muestra del presente estudio (15,28 %) sobre espermogramas normales de parejas infértiles.

En la muestra de Varghese, donde la positividad promedio en muestras de banco fue de 11%, las muestras normozoospermicas de parejas infértiles también mostraron un valor superior (13%)<sup>27</sup>.

Saleh y cols. realizaron un estudio prospectivo donde evaluaron fragmentación del ADN y tasa de embarazo, utilizando como grupo control muestras de banco de semen. Estos autores hallaron que los varones con ESCA y los que presentaban semen anormal tenían una tasa de fragmentación del ADN significativamente mayor a las muestras de banco de semen con fertilidad comprobada. En su muestra, la fragmentación del ADN se correlacionó negativamente con la tasa de fertilización ( $r: -0,70$ )<sup>28</sup>.

Si bien no hay una opinión uniforme, se ha reportado en numerosos estudios que una alta tasa de fragmentación del ADN espermático conlleva malos resultados en técnicas de reproducción asistida. En la mayor parte de estos estudios, esta alta tasa de fragmentación se correlacionaba con parámetros seminales anormales<sup>4,18,19,21,23,24</sup>.

Sin embargo, poco se sabe de lo que sucede con el ADN en las muestras seminales normales que son incapaces de concebir (ESCA).

En nuestra serie, el 23,8% de las muestras normales presentaron positividad en el Test de TUNEL superior al 20%.

Llamativamente, no se vieron diferencias estadísticas con el porcentaje hallado en las muestras de pacientes infértiles con espermograma anormal, por lo que, de acuerdo a lo anteriormente expuesto, podría inferirse que esta alta tasa de fragmentación del ADN espermático puede ser un factor determinante en la falta de concepción en el grupo con ESCA.

Debe destacarse que el Test de TUNEL evalúa células en vías de apoptosis, pero también marca positivamente espermatozoides muertos, lo que puede dar lugar a errores de interpretación<sup>24</sup>.

El hallazgo de un porcentaje de positividad en la fragmentación del ADN superior al hallado en el test de eosina demuestra la presencia de células vivas con daño en el ADN de la muestra analizada, tal como se aprecia en la **Tabla 2**.

Varghese estudió la correlación entre la integridad

del ADN y las características del semen<sup>27</sup>.

En su estudio de 373 pacientes, el 52,8% tenía parámetros seminales normales, hallando diferencias estadísticamente significativas en el daño del ADN al comparar muestras normales con anormales ( $p: 0,001$ ). Esos datos difieren de los hallados en el presente estudio. Debe destacarse que la técnica utilizada por Varghese para evaluar daño en el ADN fue la de Naranja de Acridina.

Los hallazgos de Host y cols. difieren también de nuestros resultados. Estos autores evaluaron daño en el ADN espermático utilizando el APOPTAG In situ apoptosis detection kit (técnica diferente a la utilizada en este estudio), analizando muestras normales de 20 donantes, 74 espermogramas anormales y 39 normales de pacientes con ESCA, y hallando diferencias estadísticamente significativas ( $p$ : menor de 0,05) al comparar los 3 grupos entre sí<sup>25</sup>.

Es posible que la diferencia estadística hallada entre el presente estudio y los trabajos de Host y Varghese se deba al uso de diferentes técnicas para determinar el daño del ADN espermático y a lo reducido de las muestras evaluadas.

Sin embargo, tanto Host como Saleh se han preguntado, al igual que nosotros, si esta elevada tasa de daño en el ADN espermático observada en muestras de semen normal de varones infértiles, podría ser una de las causas de la falta de embarazo en el grupo de pacientes con ESCA<sup>25,28</sup>.

## CONCLUSIONES

- Los pacientes con infertilidad de pareja y espermograma normal presentan una alta tasa de fragmentación del ADN espermático.
- Este porcentaje no muestra diferencias estadísticas con el grupo de hombres infértiles y espermograma anormal.
- La alta tasa de fragmentación del ADN observada debería ser tenida en cuenta al estudiar pacientes con ESCA.

## BIBLIOGRAFÍA

1. The ESHRE Capri workshop. Infertility Revisited: the state of the art today and tomorrow. *Hum. Reprod.* 1996;11:1779.
2. WHO: Recent advances in medically assisted conception, WHO technical report series, 820, Geneva: World Health Organization Publications, 1992.

3. Lass Amir: Investigation of the infertile couple for assisted conception. En *In vitro fertilization and assisted reproduction*, Second edition, edited by Peter Brindsen, The Parthenon Publishing Group, pág 13-26, 1999.
4. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, y cols: DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000;21:33-44.
5. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes M: Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 2001;75:674-77.
6. Sakkas D: Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod.* 2001;16:2160-5.
7. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP: Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl.* 1995;16:8.
8. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, y cols.: Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 1997;68:519-24.
9. Carrell D, Liu L, Peterson C, Jones K, Hata-saka H, Erickson L, y cols.: Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl.* 2003;49:49-55.
10. Ward WS, Coffey DS: DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod.* 1991;44:569-74.
11. Brewer LR, Corzett M, Balhorn R: Protamine induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science* 1999;286:120-3.
12. Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl.* 1992;13:342-8.
13. Kruger TF, y cols.: Sperm morphologic features as a prognostic factor of in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 1986;46:1118.
14. World Health Organization Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4<sup>th</sup> ed. New York: Cambridge University Press, 1999.) Edición en español: Editorial Panamericana 2001.
15. Gorczyza W, Gong J, Darzynkiewicz Z: Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. *Cancer Res.* 1993;53:1945-1951.
16. Benchaïb, y cols.: DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003;18:1023.
17. Henkel R, y cols.: DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod. Biomed.* 2003; Online 7:477.
18. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, y cols.: Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999;14:1039-49.
19. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G: Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril.* 2000;73:43-50.
20. Guzic D, y cols.: Sperm morphology, motility and concentration I fertile and infertile men. *NEJM* 2001;345:1388.
21. Niederberg C, y cols.: Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *J Urol.* 2006;175:661.
22. Meholi M, y cols.: Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia* 2009;41:383.
23. Larson KL, y cols.: Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2000;15:1717.
24. Barratt C, y cols.: Sperm DNA: Organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications – A position report. *Hum Reprod.* 2010;25:824.
25. Host E, y cols.: DNA strand breaks in human spermatozoa: a possible factor, to be considered in couples suffering from unexplained infertility. *Acta Obst Gynecol Scand.* 1999;78:622.
26. Sergerie M, y cols.: Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end labeling assay. *Human Reproduction* 2005;20:1921.

27. Varghese A, y cols.: Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrología* 2009; 41:207.
28. Saleh RA, y cols.: Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility* 2003;79:1597.

## COMENTARIO EDITORIAL

Hasta hace poco tiempo, se pensaba que si un espermatozoide era capaz de fecundar había cumplido con su función biológica. En los últimos años, han aparecido fuertes evidencias de que la calidad espermática influye en el desarrollo embrionario temprano, favoreciendo o no en la formación de embriones con potencialidad evolutiva. Sin embargo, esto no puede ser evaluado por la mayoría de las mediciones efectuadas en el espermograma (concentración, morfología, movilidad). En este sentido, se ha visto que el estudio del ADN espermático pueda aportar alguna herramienta diagnóstica. Se sabe que el ADN espermático puede fragmentarse por distintas causas genéticas o ambientales (quimioterapia, tabaco, varicocele, etc.), y esta fragmentación que no puede evaluarse con los parámetros del espermograma sí puede estudiarse por distintas técnicas, siendo hoy las más aceptadas la medición por TUNEL y el SCSA. En estos últimos años, se ha demostrado que en los hombres con incremento en la fragmentación de ADN hay un compromiso en la reproducción (menor porcentaje de llegada a blastocisto, menor tasa de embarazo). También existen trabajos en animales que muestran que el uso de espermatozoides con ADN fragmentado no sólo compromete el desarrollo embrionario, sino que puede generar consecuencias que se manifiesten tardíamente en la vida, como ser alteraciones del crecimiento, en ciertos patrones de conducta, envejecimiento prematuro y desarrollo de tumores mesenquimáticos. Es probable que esto tenga que ver con fenómenos epigenéticos, afectados a punto de partida del incremento en la fragmentación del ADN.

En este trabajo, se evalúa la fragmentación del ADN espermático en muestras consideradas normales y anormales, no encontrando diferencias en ambos grupos en contraste con lo presentado por otros autores.

Es importante considerar que los valores del espermograma tomados en este trabajo, efectuado en el 2009, difieren de los valores de referencia considerados actualmente por la OMS. Esto demuestra que los valores de referencia son todavía punto de discusión, y tener un espermograma por encima de esos valores no significa normalidad.

Teniendo en cuenta el bajo valor predictivo de fertilidad que tiene el espermograma, se deben buscar tests funcionales (como la fragmentación del ADN) que permitan optimizar esa predictibilidad.

Por otra parte, hay que considerar que, dado que el estudio fue realizado en un laboratorio de fertilidad, es muy probable que la mayoría de las muestras provengan de parejas infértiles y al no tener datos sobre los estudios de fertilidad de la mujer, no es factible considerar a las muestras tomadas como normales pertenecientes a esterilidad sin causa aparente.

Los datos aportados por este trabajo y los de la literatura ponen en evidencia que no existe un criterio en base al espermograma para solicitar el test de fragmentación de ADN espermático y que, posiblemente, deba incorporarse como una evaluación más en el estudio de la búsqueda de un semen fértil. Además, esto se apoya también en la posibilidad actual de ofrecer alternativas terapéuticas para estas situaciones, en especial a pacientes que ingresan en un programa de reproducción asistida.

Gastón Rey Valzacchi  
Jefe de la Sección Andrología y Reproducción,  
Servicio de Urología,  
Hospital Italiano de Buenos Aires  
Director Médico de Procreate,  
Red de Medicina Reproductiva y Molecular.