

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida

REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA FRAGMENTACIÓN ESPERMÁTICA Y SU RELACIÓN CON LA INFERTILIDAD

Autor: Sergio Grande Pérez

Tutor: Alberto Pacheco Castro

Alcobendas, Septiembre 2022

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
Causas de fragmentación	9
Terapias oncogénicas y criopreservación de la fertilidad	9
Especies reactivas de oxígeno	10
Edad	10
Aneuploidía	11
Estilo de vida	12
Técnicas diagnósticas para el estudio de la fragmentación del ADN espermático	12
Tratamiento de la fragmentación espermática	15
Fragmentación espermática y técnicas de reproducción asistida	16
Selección espermática y fragmentación	17
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	20
Estudios de fragmentación y capacitación espermática en el laboratorio	20
Fragmentación y calidad seminal	24
Fragmentación y técnicas de reproducción asistida	24
Detección de la fragmentación	25
Tratamiento de la fragmentación	25
DISCUSIÓN	25
Asociación con técnicas de reproducción asistida	26
Evaluación de parámetros seminales	27
Tratamiento de la fragmentación	28
Indicadores de la fragmentación	28
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	30

RESUMEN

El análisis rutinario del semen es insuficiente para evaluar con precisión la fertilidad debido a la incidencia cada vez mayor de la infertilidad masculina. Los hombres infértiles presentan altos niveles de fragmentación del ADN espermático, es por eso que poseen menos posibilidades de concebir de forma natural. Entre las causas que provocan fragmentación se encuentra la espermatogénesis anormal, el estrés oxidativo y la apoptosis. La detección de la fragmentación espermática se ha convertido en un método eficaz para el análisis del semen. Por tanto, es un punto de interés para la investigación en el campo de la medicina reproductiva como un indicador para evaluar la calidad espermática y, por consiguiente, la fertilidad masculina. Así es que la fragmentación puede estar implicada en los resultados de la reproducción asistida y en el desarrollo de la descendencia. Los métodos más eficaces para poner de manifiesto la fragmentación del ADN espermático son el ensayo SCSA, el ensayo TUNEL, el ensayo COMET y el ensayo SCD. Actualmente, el estudio del índice de fragmentación y los mecanismos subyacentes pueden mejorar eficazmente los tratamientos clínicos de reproducción, así como el asesoramiento en parejas que luchan contra una infertilidad de causa desconocida que se someten a un tratamiento de reproducción asistida. El objetivo de este trabajo es hacer una revisión bibliográfica acerca de la fragmentación del ADN espermático y saber en qué punto se encuentra en la actualidad en relación con las técnicas de reproducción asistida y la infertilidad masculina.

Palabras clave: fragmentación del ADN espermático, infertilidad masculina, espermatozoide, detección de la fragmentación, TRA.

ABSTRACT

Routine semen analysis is insufficient to accurately assess fertility due to the increasing incidence of male infertility. Infertile men have high levels of sperm DNA fragmentation, which is why they are less likely to conceive naturally. Among the causes of fragmentation are abnormal spermatogenesis, oxidative stress and apoptosis. The detection of sperm fragmentation has become an effective method for semen analysis. It is therefore a point of interest for research in the field of reproductive medicine as an indicator to assess sperm quality and, consequently, male fertility. Thus, fragmentation may be implicated in the results of assisted reproduction and in the development of offspring. The most effective methods for revealing sperm DNA fragmentation are the SCSA assay, the TUNEL assay, the COMET assay and the SCD assay. Currently, the study of the fragmentation index and the underlying mechanisms can effectively improve clinical reproductive treatments as well as counseling in couples struggling with infertility of unknown cause undergoing assisted reproductive treatment. The aim of this work is to make a literature review about sperm DNA fragmentation and to know where it stands nowadays in relation to assisted reproductive techniques and male infertility.

Key words: sperm DNA fragmentation, male infertility, spermatozoa, fragmentation detection, ART.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad se define como la incapacidad de lograr un embarazo exitoso después de 12 meses de relaciones sexuales sin protección [1]. La infertilidad masculina es un problema importante que afecta al 20% aproximadamente de los hombres en países occidentales que se ha diagnosticado tradicionalmente mediante la evaluación microscópica de la concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides en el eyaculado, analizando así la calidad del mismo. La causa de la infertilidad puede atribuirse al hombre, a la mujer o a ambos miembros de la pareja, y, en un número significativo, la causa de la infertilidad es inexplicable, por lo que se debe realizar una evaluación simultánea de ambos miembros de la pareja infértil [1]. En particular, la infertilidad masculina es un trastorno del sistema reproductivo causado principalmente por factores masculinos que implican deficiencias en el semen, condiciones genéticas, defectos anatómicos y alteraciones endocrinas [2].

Las causas conocidas de infertilidad masculina representan del 30% al 50%, el resto son causas desconocidas o idiopáticas [1]. Numerosas enfermedades genéticas y defectos congénitos se relacionan con la contribución paterna [3]. La mitad del ADN de la progenie procede de la unidad paterna, por esta razón es de suma importancia considerar los efectos de los daños en el ADN de los espermatozoides ya que un requisito para el desarrollo normal del embrión y del posterior embarazo es la integridad del ADN espermático [4, 5]. La infertilidad puede ocurrir incluso cuando los resultados del análisis de semen son normales, y puede ser causada por la fragmentación del ADN espermático [6].

En la espermatogénesis (Fig 1), las espermatogonias después de una serie de divisiones mitóticas se diferencian en espermatocitos primarios. Estos, tras una recombinación meiótica, dan lugar a espermátidas haploides que, gracias a la espermiogénesis, originan los espermatozoides. Por tanto, la maduración de las células germinales implica una reorganización que requiere una remodelación de la cromatina para generar gametos haploides [5]. Además, para completar el desarrollo, las espermátidas deben pasar por el epidídimo donde ocurre un entrecruzamiento de disulfuros. Aquellos espermatozoides con mayor nivel de daño en su ADN son los que poseen menor nivel de entrecruzamiento de disulfuros en su cromatina [5].

La hormona FSH (heterodímero glicoproteico) regula el desarrollo y las funciones de las gónadas.

En el testículo adulto, la FSH regula la espermatogénesis actuando sobre las células de Sertoli. Hay pruebas de que los polimorfismos del receptor de la hormona FSH (FSHR) están asociados a la infertilidad masculina. El curso normal de la espermatogénesis depende de la adecuada secreción hipofisaria de FSH, de la hormona luteinizante (LH) y de la secreción testicular de testosterona [7].

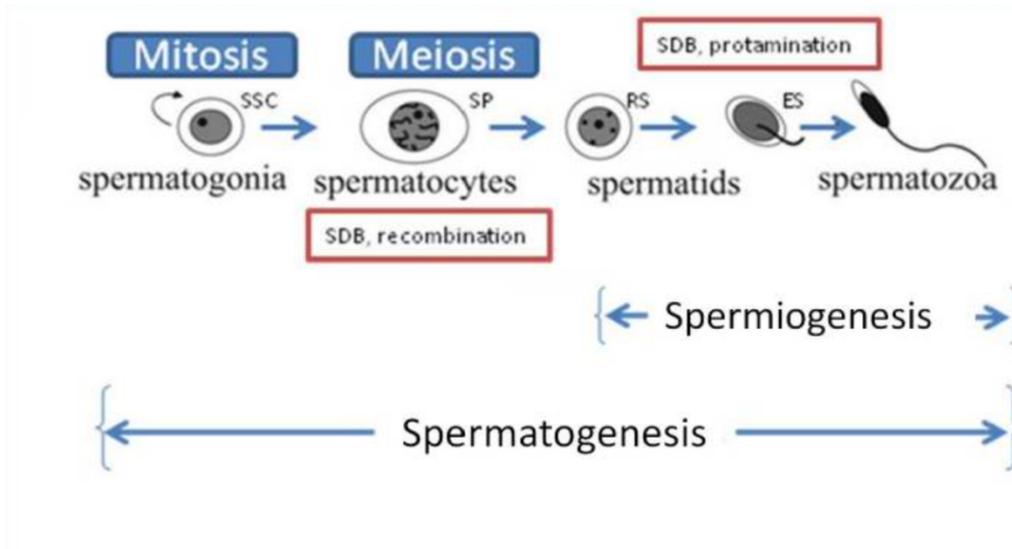


Fig 1. Esquema de la espermatogénesis iniciada con la proliferación mitótica de las espermátogonias (SSC; $2n$) seguida de la primera división meiótica (I) que da lugar a la formación de espermátocitos primarios y secundarios (SP). Mediante la división meiótica (II), los 2° SP generan espermátidos redondas haploides (RS) que entran en el proceso de diferenciación de la espermiogénesis para producir espermátidos alargados (ES) y espermatozoides maduros. [5]

La cromatina del espermatozoide humano durante la espermatogénesis parece ser muy susceptible a los cambios estructurales [8]. Además, la espermiogénesis está asociada a la aparición de roturas fisiológicas de la cadena de ADN. La densa compactación del ADN, otorgada gracias a las protaminas, le genera protección frente a agresiones exógenas. A pesar de ello, los niveles de daños en el ADN espermático son altos en hombres infértiles. El ADN de los espermatozoides es susceptible a sufrir daños si no se completa el empaquetamiento de la cromatina correctamente durante la espermatogénesis (Fig 2), existiendo tres opciones frente a este daño: una de ellas sería activar la vía apoptótica conduciendo a la muerte celular, otra tolerar esta lesión dando lugar a mutaciones, y la tercera sería reparar esta lesión a través de la reparación por escisión de nucleótidos, la reparación por escisión de bases, la reparación de desajustes, la reparación post-replicación y la reparación de roturas de doble cadena de ADN [5].

La capacidad de reparar daños de la cromatina espermática es muy eficiente durante las primeras etapas de la espermatogénesis, mientras que es muy limitada ya en la espermátida madura por la gran compactación de esta y la reducción de los componentes citoplasmáticos que impiden su reparación [8].

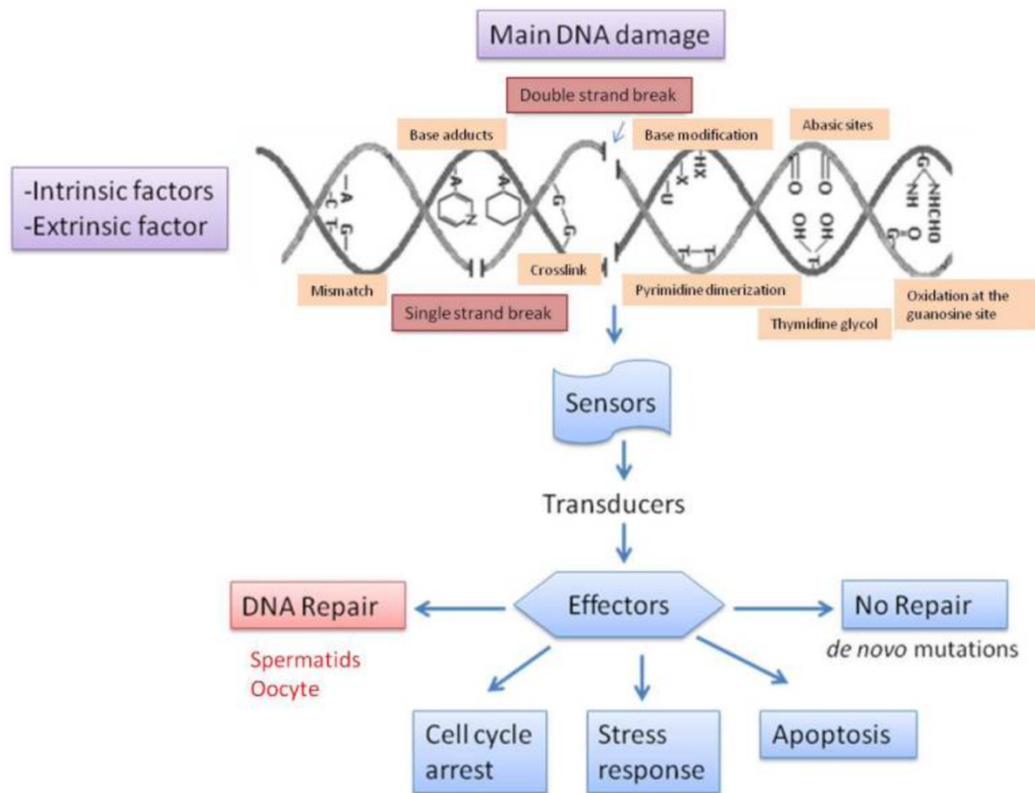


Fig 2. Ppales causas de daños en el ADN espermático. [5]

Un requisito básico para que un espermatozoide pueda fecundar con éxito un ovocito y transmitir la información genética paterna es la integridad de la cromatina [8]. No obstante, los espermatozoides con fragmentación siguen teniendo potencial de fecundación y desarrollo gracias a que el ovocito, cigoto y blastocisto podrían reparar el daño [4]. En algunos casos el ovocito con su maquinaria de reparación se vale para revertir el daño en el ADN del espermatozoide, Ahmadi et al. sugieren que el ovocito tiene la capacidad de reparar el daño en el ADN del espermatozoide cuando está dañado en menos de un 8%. Aún así, pueden conducir al desarrollo de embriones mosaico después de esta reparación [9].

Puede ser abortado también en una fase posterior o pueden introducirse mutaciones tales como deleciones o errores de secuencia (descendencia anormal) [5], lo que explicaría la mayor tasa de abortos espontáneos [9].

En cuanto a la relación de la fragmentación con la morfología se ha descrito que, en los hombres infértiles, los espermatozoides con una morfología aparentemente normal pueden presentar fragmentación del ADN, y la presencia de una mayor proporción de espermatozoides normales con ADN dañado se asoció negativamente con la calidad del embrión [8]. Se ha sugerido que el impacto de la fragmentación en el éxito reproductivo se observaría después de la fecundación, dependiendo del equilibrio entre el tipo de daño, el porcentaje de daño en el ADN del espermatozoide y la capacidad de reparación del ADN del ovocito debido a que, el daño en el ADN espermático puede provocar un efecto tardío relacionado con la expresión genética paterna en el embrión de cuatro a ocho células. Horta et al. han demostrado recientemente de forma experimental que, a pesar de los altos niveles de fragmentación, la fecundación por FIV/ICSI puede producirse con normalidad y corregirse con ovocitos jóvenes, permitiendo así un desarrollo embrionario normal [2].

La fragmentación de ADN espermático incluye tanto fragmentación de ADN nuclear como fragmentación del ADN mitocondrial. Venkatesh et al. demostraron que existe una alta incidencia de fragmentación de ADN mitocondrial dentro del citoplasma de los espermatozoides de varones infértiles [7]. La fragmentación del ADN nuclear de los espermatozoides se caracteriza por roturas de la cadena de ADN simple o monocatenario o de doble hebra o bicatenario [5]. Las roturas de la doble cadena son más dañinas ya que conducen a la inestabilidad genómica y a la muerte celular o apoptosis si no se reparan como es debido ya que, en general, el daño del ADN monocatenario es más fácil de reparar que el del ADN bicatenario. Por lo general, los fragmentos monocatenarios de ADN son más comunes que los bicatenarios [7].

A pesar de la evolución en los estudios, la fragmentación del ADN de los espermatozoides como prueba diagnóstica no está estandarizada en las clínicas de reproducción por la falta de uniformidad en los ensayos y por la falta de conocimientos sobre la etiología de la fragmentación.

Causas de fragmentación

El desarrollo de las investigaciones muestra la diversidad en cuanto al origen de la fragmentación, comprobándose la relación entre esta y los efectos inadvertidos durante la espermiogénesis, la maduración anormal de los espermatozoides, el estrés oxidativo que puede desempeñar una función negativa por las especies reactivas de oxígeno pudiendo dañar las estructuras celulares, incluidas la molécula de ADN, como consecuencia de mecanismos apoptóticos o del fracaso de los sistemas de defensa antioxidante, también influye el varicocele debido a que da lugar a espermatozoides con una cromatina menos condensada, aproximadamente el 50% de los individuos con varicocele tienen una fragmentación elevada [2] (siendo ésta una de las posibles causas de infertilidad), las infecciones bacterianas por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma*, la edad, siendo menor la fragmentación el hombres menores de 35 años, temperaturas elevadas de los testículos, y la reacción a los medicamentos como quimioterapia o radioterapia, en general los tratamientos contra el cáncer afectan negativamente a la fertilidad masculina. Por último, algunas vacunas pueden llegar a afectar negativamente a la calidad del ADN seminal, aunque este impacto negativo puede ser reversible y, por esta razón, debe evitarse recoger muestras de semen hasta al menos un mes después de la vacunación [3, 5].

Terapias oncogénicas y criopreservación de la fertilidad

Aunque el efecto perjudicial de la terapia del cáncer sobre la calidad del semen no es universal, la criopreservación es la única opción fiable para la preservación de la fertilidad en los hombres en edad reproductiva. Las muestras se recogen normalmente por masturbación y el semen se criopreserva utilizando protocolos de congelación lenta o rápida. Estas muestras se utilizarán para un tratamiento de producción asistida después de la congelación (para que estos pacientes puedan tener hijos biológicos). Se descongela una alícuota para evaluar la criosupervivencia de los espermatozoides, lo que también ayuda a estimar el número total de espermatozoides móviles disponibles y aconsejar sobre las perspectivas de concepción asistida. El proceso de criopreservación puede perjudicar la calidad del semen, ya que puede aumentar la producción de ROS. Aunque los efectos negativos de la criopreservación sobre los parámetros convencionales del semen están bien documentados, la controversia sigue rodeando su impacto sobre la integridad del ADN. La congelación convencional y la vitrificación son los dos métodos más utilizados para la criopreservación.

No obstante, la evaluación de los niveles de fragmentación podría ayudar a implementar técnicas para reducir los riesgos del proceso de criopreservación en los pacientes más vulnerables [2]. Las pruebas de fragmentación del ADN espermático antes del almacenamiento de esperma pueden proporcionar información complementaria para algunos pacientes sobre la calidad del semen. Esta información podría ayudar a seleccionar el método óptimo de congelación espermática y guiar la posterior decisión de utilizar un tratamiento u otro.

Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) contribuyen a la fragmentación y a la infertilidad masculina. El estrés oxidativo se produce cuando la generación de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes normales del organismo, provocando daños celulares. La secreción seminal se compone de varios tipos de células, como espermatozoides maduros e inmaduros, células redondas en varias fases de la espermatogénesis, leucocitos y células epiteliales. Además, la generación de ROS es mayor en los pacientes que fuman y beben. Sin embargo, algunas condiciones médicas también provocan la generación de ROS, como el varicocele, las infecciones del tracto genital y las lesiones de la médula espinal. La edad y la infertilidad también desempeñan un papel importante en la generación de ROS. Se ha observado que la generación de ROS era mayor en las muestras de semen de los pacientes infértiles que en las de los pacientes fértiles, y que la fragmentación aumentaba como resultado de la mayor concentración de ROS en las muestras de semen. El estrés oxidativo se ha relacionado con una mala motilidad, lo que lleva a una mala formación del embrión, al aborto y a la infertilidad [10].

Edad

El envejecimiento es un proceso natural inevitable que afecta a todos los individuos introduciendo una serie de cambios fisiológicos en nuestro organismo. Uno de estos cambios corresponde con la disminución de la capacidad reproductiva ya que el volumen del eyaculado disminuye, los niveles de gonadotropina aumentan, disminuyen los de testosterona y disminuye también el número de células de Leydig, Sertoli y germinales [11, 12]. Algunos autores sugieren que las alteraciones morfológicas se producen en relación con este envejecimiento. La edad supone uno de los factores que más influye en la fragmentación espermática ya que es capaz de afectar al grado de compactación del ADN espermático. Esto está ligado de forma directa con la concentración de radicales libres del oxígeno (ROS). Durante el envejecimiento tiene lugar una peroxidación de los lípidos cuando los dobles enlaces de un ácido graso son atacados por un radical libre, creando así un radical de peróxido lipídico.

El resultado final de este proceso es un daño marcado en las membranas lipídicas, afectando así a la fluidez de membrana. Los espermatozoides son especialmente vulnerables a esta peroxidación lipídica ya que contienen elevadas concentraciones del ácido docosahexaenoico [11]. Cabe destacar que la destrucción estructural de las membranas de los espermatozoides conduce a la exposición directa del ADN nuclear de los espermatozoides a las especies reactivas de oxígeno en el plasma seminal (principalmente los glóbulos blancos que producen ROS en el plasma seminal), lo que provoca el ataque del ADN de los espermatozoides por ROS y una amplia gama de roturas y destrucción de la cadena simple y doble del ADN, lo que finalmente provoca daños en la estructura genética de los espermatozoides y defectos funcionales, lo que conduce a la infertilidad [7].

Aneuploidía

La aneuploidía espermática y la fragmentación del ADN espermático en los hombres infértiles es más frecuente en comparación con la población general. Existe una correlación significativa positiva entre la aneuploidía espermática y la fragmentación del ADN espermático [13].

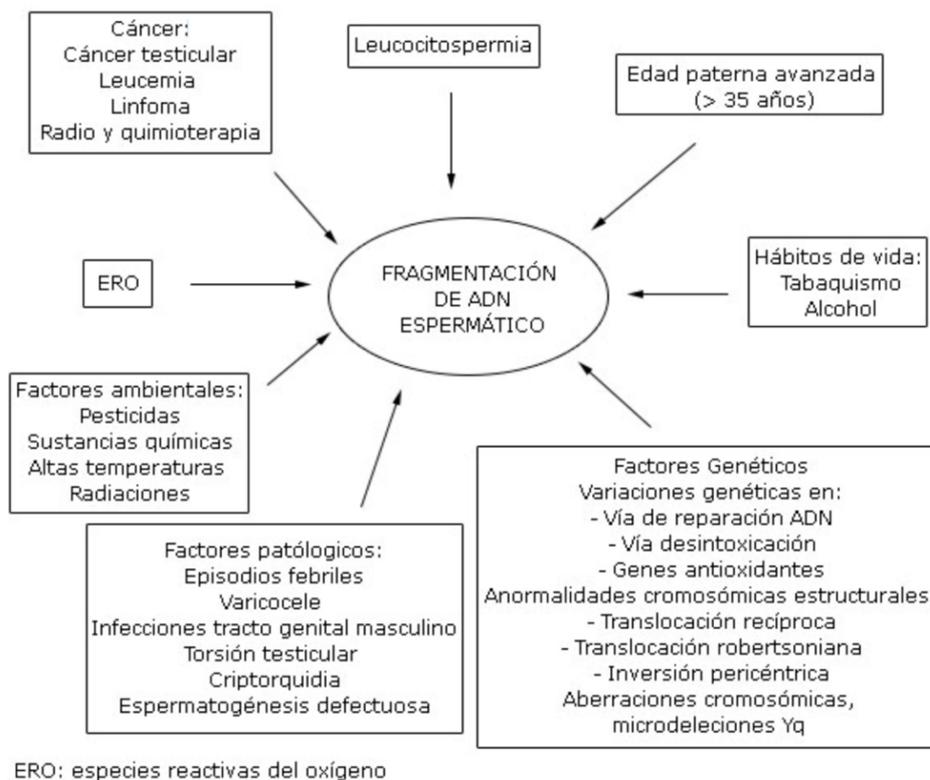


Fig 3. Principales factores causantes de fragmentación espermática.

Estilo de vida

El medio ambiente y el estilo de vida pueden contribuir a aumentar el porcentaje de fragmentación del ADN [4], se ha documentado una asociación positiva entre la exposición a tóxicos contaminantes del aire (por ejemplo, partículas, óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, ozono) y la fragmentación espermática. Entre los factores relacionados con el estilo de vida, fumar tabaco influye negativamente en la integridad de la cromatina de los espermatozoides, el consumo de cannabis también puede perjudicar la calidad del ADN de los espermatozoides. En esta línea, la obesidad también podría afectar a la calidad del ADN de los espermatozoides, aunque las pruebas son menos convincentes. Algunos estudios sugieren que los cambios en el estilo de vida podrían mejorar la calidad del ADN espermático [2].

Por último, existen varias teorías sobre la etiología de la fragmentación. Una de ellas es un modelo de dos pasos para el desarrollo de la fragmentación, en el primer paso el ADN de los espermatozoides se debilita por un error en la espermatogénesis perjudicando la remodelación de la cromatina y, en el segundo paso, el ADN es más vulnerable al estrés oxidativo. Otra teoría dice que la fragmentación ocurre después de una apoptosis interrumpida activada por las condiciones testiculares, esta teoría especula que la apoptosis podría ser la principal causa de fragmentación. Estas teorías no son excluyentes, la inmadurez de la cromatina o el estrés oxidativo podrían desencadenar la activación de la apoptosis [3].

Técnicas diagnósticas para el estudio de la fragmentación del ADN espermático

Desde la década de los cuarenta, se lleva estudiando la estructura del ADN, pero no fue hasta los años ochenta que se introdujo el concepto de fragmentación del ADN espermático relacionándose, además, con la infertilidad. Este hecho fue gracias al avance de la tecnología en biología molecular [3]. Evenson et al. desarrollaron un ensayo a partir del cual permitieron detectar la fragmentación del ADN por citometría de flujo denominado ensayo de la estructura de la cromatina del espermatozoide (SCSA), el ADN espermático se desnaturaliza en los lugares de rotura y se tiñe con colorante catiónico fluorescente naranja de acridina, cuando el láser del citrómetro de flujo incide sobre la célula, el naranja de acridina emite un color verde cuando se une al ADN de doble cadena y un color rojo cuando se une al de cadena simple, el índice de fragmentación del ADN (DFI) se describe como la relación entre la fluorescencia roja y la verde junto con la roja, en porcentaje.

Esta técnica se ha convertido en la prueba más utilizada comercialmente para investigar las causas de infertilidad masculina relacionadas con daños en el ADN de los espermatozoides y anomalías en la cromatina. Por otro lado, también en la década de los ochenta, se avanzó en el campo de la electroforesis haciéndose posible la detección de la fragmentación espermática a través del ensayo COMET que mide cualitativamente el grado de daño del ADN espermático mediante la visualización de roturas de cadena simple y doble utilizando la electroforesis, su importancia clínica ha sido confirmada por varios autores, pero los protocolos no se han estandarizado hasta el punto de que sea posible comprender y comparar plenamente los resultados de las investigaciones de varios investigadores, algunos incluso no lo recomiendan por su difícil visualización en ocasiones.

En los años noventa se evolucionó al ensayo TUNEL donde una desoxinucleotidil transferasa terminal marca las roturas de la cadena de ADN con nucleótidos dUTP fluorescentes pudiéndose realizar por citometría de flujo o por microscopía, mide directamente el daño del ADN de los espermatozoides, además la evaluación puede llevarse a cabo con una pequeña cantidad de espermatozoides [14]. En la siguiente década surgieron otros métodos para determinar la fragmentación, el ensayo de detección de rotura de ADN-hibridación in situ (DBD-FISH) y el ensayo de dispersión de la cromatina del esperma (SCD) [3], esta última elimina las proteínas nucleares mediante una solución de lisis dando lugar a unos pequeños halos o no se detectan halos evidentes en aquellos con ADN fragmentado, por lo que la integridad del ADN de los espermatozoides puede juzgarse observando la presencia o ausencia del halo en el microscopio. Se trata de una tecnología de detección fácil de manejar, barata y muy precisa [7].

La cuestión más importante en relación con estos métodos es si revelan el mismo tipo de daño y si están estandarizados. Las técnicas más utilizadas para diagnosticar la fragmentación del ADN espermático con TUNEL y SCSA, estas técnicas no son equivalentes puesto que revelan diferentes tipos de daño [5]. El ensayo TUNEL cuantifica la rotura del ADN por incorporación de dNTPs fluorescentes en los extremos del ADN de una y de dos hebras (en presencia de la desoxinucleotidil transferasa) [4], mientras que el ensayo SCSA determina el grado de desnaturalización del ADN. Hay estudios que indican que la fragmentación medida por SCSA no se relaciona con las bajas tasas de fecundación, ni con la calidad del embrión, sino con las tasas de aborto espontáneo.

En cuanto al ensayo COMET y al SCD, ambos son métodos más sencillos que sirven para detectar daños en el ADN de células individuales y en ambos se tiñe el ADN previamente lisado para analizarlo al microscopio. En el ensayo COMET, además, se añade una electroforesis para diferenciar entre el ADN intacto del dañado [5].

Metodologías	Método	Equipo	Ventajas	Desventajas
Marcaje de roturas del ADN	TUNEL	Microscopio de fluorescencia Citometría de flujo	Cumple con parámetros de control de calidad	Equipamiento complejo y costoso
	ISNT	Microscopio de fluorescencia Citometría de flujo	Reacción de marcaje directo	Equipamiento complejo y costoso
Miden la capacidad del ADN para desnaturalizarse	SCSA	Citometría de flujo	Punto de corte (30 %), diferencia pacientes fértiles e infértiles	Instrumentación costosa Capacitación técnica
	SCD	Microscopio campo claro Microscopio fluorescencia	Tecnología simple, y no requiere equipamiento especial	Evaluación microscópica intensa Consume tiempo Pueden surgir resultados subjetivos
	COMETA	Microscopio fluorescencia Electroforesis de ADN	Bajo costo	Lento en ejecución Requiere observador de experiencia
	DBD-FISH	Microscopio de fluorescencia	Revela modificaciones estructurales de la cromatina	Procedimiento complejo y costoso

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes de las metodologías utilizadas para evaluar la fragmentación del ADN espermático.

Aunque el mejor ensayo para cuantificar la fragmentación del ADN espermático y sus umbrales óptimos están aún por definir, los cuatro principales ensayos mencionados anteriormente (SCSA, COMET, SCD y TUNEL) proporcionan información fiable sobre la integridad del ADN espermático en la subfertilidad. Es vital comprender cómo informa cada prueba de los resultados [2].

Un reciente meta-análisis de Cissen et al. considera que entre todas las metodologías utilizadas para la evaluación de la fragmentación del ADN espermático, los test SCSA y SCD son los que tienen más baja capacidad predictiva, a diferencia del TUNEL y el ensayo COMET que poseen una mayor sensibilidad y especificidad que los anteriores [8]. Las pruebas de fragmentación del ADN espermático son válidas también para detectar y diferenciar a los varones fértiles de los infértiles relacionando los niveles elevados de fragmentación con tasas de fecundación más bajas, peores tasas de implantación y mayor incidencia de aborto [5]. Se han utilizado para obtener un conocimiento más profundo de la calidad del espermatozoide debido a la función crítica de la integridad del ADN espermático para un desarrollo embrionario y un resultado reproductivo exitoso. A pesar de la sólida asociación entre la fragmentación espermática y la infertilidad, el conocimiento limitado de las características de las pruebas de fragmentación ha impedido la aplicación de estas pruebas en la práctica rutinaria. Los resultados de la fragmentación pueden aumentar significativamente en función de la duración de la abstinencia [2]. Al igual que el análisis de semen convencional, las pruebas de fragmentación no pueden discriminar perfectamente a los hombres fértiles de los infértiles o a las parejas que tendrán un ciclo de TRA exitoso de las que no lo tendrán.

Tratamiento de la fragmentación espermática

Hay investigaciones que indican la existencia de métodos para tratar la fragmentación del ADN espermático. Actualmente, estos principales métodos de tratamiento son el tratamiento antioxidante, la eliminación de las causas de la enfermedad y la medicina tradicional china. El estrés oxidativo es un mecanismo importante para la producción de la fragmentación, por lo que la suplementación con antioxidantes puede ser eficaz. Los ingredientes activos son las vitaminas, los alcaloides, los polisacáridos, los polifenoles y los flavonoides, que pueden eliminar los ROS con gran eficacia y baja toxicidad, también el zinc, como antioxidante, protege a los espermatozoides de los daños causados por el estrés oxidativo. Los datos relativos a la terapia antioxidante oral en hombres infértiles con fragmentación espermática elevada son limitados, por lo que es necesario seguir investigando para determinar su utilidad clínica en términos de éxito del embarazo, así como la duración del tratamiento [15].

Por otro lado, evitando los factores de riesgo de producción de fragmentación se evitaría la misma y sería una medida para prevenirla.

Hay muchas causas en torno al entorno y al estilo de vida que se relacionan con el aumento de la fragmentación espermática, ejemplos de ello serían el tabaquismo, el consumo de alcohol, las toxinas ambientales, el uso prolongado de fármacos hormonales y los hábitos de vida poco saludables. También la medicina tradicional china se ha utilizado durante mucho tiempo para tratar la infertilidad masculina, por tanto, podría ser de utilidad a la hora de tratar la fragmentación [7]. En conjunto, los datos disponibles sobre la utilidad clínica de los cambios en el estilo de vida como medio para reducir los valores de fragmentación son mínimos. Se necesitan más investigaciones, pero se sugiere el cambio de alimentación para beneficiar a los hombres con altos valores de fragmentación. La información proporcionada por las pruebas de fragmentación podría ayudar a implementar modificaciones en el estilo de vida, así como a controlar el cumplimiento de los pacientes en los programas de mejora de la salud. Además, el conocimiento del estado de fragmentación puede utilizarse para reforzar el asesoramiento de los pacientes en relación con la salud reproductiva general y el pronóstico del tratamiento. También la terapia hormonal con la administración exógena de FSH podría reducir la fragmentación en los hombres con infertilidad idiopática [15]. Por último, la reparación quirúrgica del varicocele mejoró los parámetros del semen (la varicolectomía microquirúrgica por vía subinguinal se considera el método más eficaz) [14].

Fragmentación espermática y técnicas de reproducción asistida

Las pruebas actuales indican que las tasas de fragmentación son menores en los espermatozoides testiculares que en los espermatozoides eyaculados de los hombres infértiles que se someten a tratamientos de reproducción asistida.

El ICSI con espermatozoides testiculares parece ser más ventajosa que la ICSI con espermatozoides eyaculados para los hombres infértiles con altos niveles de fragmentación en el semen, con mejoras en las tasas de embarazo clínico y aborto espontáneo [15]. Muchos estudios han demostrado que los daños en el ADN del espermatozoides afectan a la concepción natural dificultándola o imposibilitándola cuando esta es superior a un 30 %. Aunque los investigadores tienen opiniones controvertidas sobre la relación entre el índice de fragmentación del ADN espermático y los resultados de los embarazos de FIV/ICSI, se ha reconocido ampliamente el efecto negativo de un índice de fragmentación espermático elevado en los resultados de los embarazos naturales.

Se ha demostrado que el índice de fragmentación espermática es significativamente elevado en las parejas con infertilidad inexplicable.

Las tasas de abortos tempranos son significativamente más elevadas entre las personas con un índice de fragmentación alto [16]. Se ha informado también que un mayor grado de daño en el ADN de los espermatozoides en parejas que planifican un embarazo sin conocimiento previo de su fertilidad podría hacer que tardaran más en concebir de forma natural y reducir la probabilidad de un embarazo exitoso [14]. Por esta razón, las pruebas de fragmentación son relevantes para la fertilidad masculina y pueden aplicarse a las parejas que luchan contra la infertilidad con una causa desconocida y utilizarse cuando se asesora a dichas parejas con respecto a los futuros métodos de reproducción asistida.

La continua demanda de tratamientos de reproducción asistida ha llevado a la necesidad de mejorar los procedimientos y las tecnologías que se utilizan en los laboratorios. En la actualidad, varios son los métodos utilizados en este campo en cuanto a la preparación y capacitación del semen, pero no hay consenso sobre cuál es el más eficaz. Sin embargo, estas técnicas no serían viables para diferenciar entre espermatozoides con el ADN fragmentado de los que no lo tienen, a pesar de que la fragmentación está correlacionada con otros parámetros medibles (por ejemplo, la motilidad progresiva) [11].

Selección espermática y fragmentación

La selección de los espermatozoides en el tracto genital femenino, in vivo, comienza desde la eyaculación de las células germinales masculinas en la parte superior de la vagina, cuando los espermatozoides tienen que salir del plasma seminal, penetrar en el moco cervical y ascender por el tracto genital femenino hasta encontrarse con el ovocito para su fecundación en la ampolla de la trompa de Falopio. Este proceso de selección tiene como objetivo seleccionar los espermatozoides más capaces, con una alta integridad del ADN, madurez y rendimiento para fecundar con éxito los ovocitos y producir un embrión de buena calidad [17].

El objetivo principal del procesamiento del semen en las técnicas de reproducción asistida es seleccionar los espermatozoides con buena viabilidad y reducir el porcentaje de los morfológicamente anormales [11].

La centrifugación por gradiente de densidad (DGC) y el procesamiento del eyaculado por swim-up (SU) son, actualmente, las técnicas más utilizadas en la preparación del semen. Ambas dependen de la centrifugación y de la migración de los espermatozoides [17]. En los últimos años, estudios comparativos de estos procedimientos han demostrado como los distintos métodos de preparación del semen afectan a marcadores moleculares tales como el DFI, ambas técnicas ayudan a minimizar la fragmentación del ADN espermático [6]. A pesar de ello, se han desarrollado varias técnicas avanzadas de selección de espermatozoides para imitar los mecanismos de selección natural: MACS, donde se eliminan los espermatozoides apoptóticos y PICSI, también conocida como ICSI fisiológico, es un método de selección de espermatozoides basado en el grado de maduración de los mismos. El valor de utilizar una técnica de selección espermática avanzada en la ICSI ha sido estudiado por muchos investigadores concluyendo que tanto MACS como PICSI son herramientas adecuadas para la selección de espermatozoides en pacientes con fragmentación que se someterán a ICSI, ambas técnicas mostraron resultados aproximadamente similares en el análisis [17].

Estudios que han correlacionado el índice de fragmentación del ADN espermático con los parámetros del semen concluyeron que la concentración, la motilidad progresiva y la morfología normal fueron significativamente menores en los pacientes con fragmentación cuando se comparan con los pacientes normozoospermicos. El volumen, por contraposición, no difiere. La evidencia actual reconoce el estrés oxidativo como una causa importante de la fragmentación del ADN espermático, por tanto, altos valores de fragmentación se deben a altas concentraciones de ROS producidas por la disminución de la calidad del semen en estos pacientes [18].

La investigación sobre la fragmentación del ADN de los espermatozoides está en fase de exploración. Sin embargo, investigaciones anteriores han demostrado que la fragmentación espermática tiene un gran valor predictivo en el campo de la tecnología de reproducción asistida [7]. Dado el papel crítico de la integridad del ADN espermático para una fecundación normal, un desarrollo embrionario sano y unos resultados reproductivos satisfactorios se han utilizado para adquirir información sobre la calidad del esperma a nivel molecular [2].

En la actualidad, la mayoría de los estudios se han centrado principalmente en el efecto de la fragmentación espermática sobre la fecundación, el potencial de desarrollo embrionario y las tasas de aneuploidía, embarazo y aborto.

Sin embargo, pocos estudios han informado sobre el efecto de esta fragmentación espermática en los resultados neonatales, incluidos las muertes neonatales, el sexo, la edad gestacional, la prematuridad, el peso al nacer y los defectos de nacimiento en los recién nacidos [19]. Se ha demostrado que no hay diferencias significativas en la tasa de nacidos vivos en las parejas sometidas a ciclos de ICSI convencional a aquellas parejas con infertilidad causada por fragmentación. Se ha informado de que las incidencias de prematuridad y el bajo peso en los recién nacidos son significativamente mayores después de la FIV/ICSI que, en la concepción natural, pero no influye la fragmentación. Tampoco influye en los porcentajes de prematuridad, ni en la proporción de sexos de los recién nacidos [19]. Los niveles más altos de fragmentación del ADN (fragmentación superior al 30%) en los espermatozoides se han asociado con menores tasas de formación de blastocistos, Nasr-Esfahani et al. informaron que los embriones derivados de espermatozoides con altos niveles de daño en el ADN tienen menos probabilidades de alcanzar etapas posteriores de desarrollo o de blastocisto indicando que la fragmentación del ADN espermático afecta significativamente a la blastulación [20].

La mayoría de los meta-análisis de FIV/ICSI coinciden en que la integridad del ADN espermático influye en el éxito reproductivo. Varios estudios mostraron que una fragmentación elevada se asociaba con tasas de embarazo reducidas con la FIV convencional pero no con la ICSI. Este argumento está respaldado por Meseguer et al. que demostraron que los ovocitos de alta calidad de las donantes pueden compensar el impacto negativo del daño en el ADN del espermatozoide en el embarazo. A diferencia de la FIV, los espermatozoides de la ICSI se inyectan en el ovocito a las pocas horas de la eyaculación. Esta diferencia técnica puede protegerlos de los daños inducidos por el laboratorio; pueden producirse daños iatrogénicos cuando los espermatozoides se mantienen *in vitro* durante largos períodos [2]. Por último, los espermatozoides pueden ser una fuente de ROS, si se utilizan en la FIV, el ovocito puede estar expuesto a una agresión oxidativa durante la incubación.

El índice de fragmentación del ADN espermático está correlacionado negativamente con la densidad espermática, la viabilidad y la morfología espermática normal, aunque está correlacionado positivamente con la edad, el tiempo de abstinencia y los hábitos de vida poco saludables (fumar y beber alcohol).

Un índice de fragmentación elevado no afecta a la tasa de embarazo clínico tras una inseminación intrauterina, pero puede aumentar el riesgo de aborto temprano [16].

Como tecnología cada vez más común en las pruebas clínicas para la reproducción, la fragmentación espermática ha demostrado ser muy valioso en la evaluación de la fertilidad masculina, pero su importancia como predictor de los resultados del embarazo tras un tratamiento de reproducción asistida requiere más investigación.

OBJETIVOS

El objetivo principal fue hacer una revisión bibliográfica acerca de la fragmentación del ADN espermático y saber en qué punto se encuentra en la actualidad en relación con las técnicas de reproducción asistida junto con las consecuencias sobre la infertilidad masculina. Los objetivos concretos fueron analizar en profundidad las distintas causas y ver los diferentes métodos diagnósticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda exhaustiva de estudios que examinaban la relación entre las condiciones de infertilidad masculina y la fragmentación del ADN espermático. La búsqueda se llevó a cabo en la base de datos PubMed en función de las siguientes palabras clave: *sperm DNA fragmentation*, *male infertility*, fragmentación en relación con TRA y *fragmentation detection techniques*.

Se han incluido estudios prospectivos, retrospectivos, retrospectivos descriptivos y de cohorte, así como revisiones sistemáticas y meta-análisis. Las referencias de los artículos encontrados se analizaron con el objetivo de analizar estudios adicionales que poder incorporar.

RESULTADOS

Estudios de fragmentación y capacitación espermática en el laboratorio

Valores del índice de fragmentación de muestras de esperma no tratadas y tratadas con centrifugación por gradiente de densidad se analizaron mostrando que los valores de la fragmentación, en comparación con los valores de referencia, mejoraron significativamente después de los tratamientos con centrifugación por gradiente de densidad.

Characteristics	Mean \pm SD (range) or n (%)
Age, years	34.63 \pm 6.36 (25–53)
pH	7.29 \pm 0.45 (6.5–8.5)
Sexual abstinence, days	4.25 \pm 1.39 (2–7)
Semen volume, mL	2.63 \pm 0.93 (2–6)
Sperm concentration, $\times 10^6$ /mL	37.68 \pm 15.33 (15–73)
Total sperm number, $\times 10^6$	93.47 \pm 62.22 (28–358)
Sperm vitality, %	83.97 \pm 6.82 (61–93)
Progressive motility	31.32 \pm 6.90 (11–48)
<32%	31 (49.2%)
\geq 32%	32 (50.8%)
Number of sperm progressive motility, $\times 10^6$	29.41 \pm 20.91 (7.98–110.83)
Normal sperm morphology	3.68 \pm 1.46 (1–7)
<4%	26 (41.3)
\geq 4%	37 (58.7)
DFI, %	27.25 \pm 18.98 (6–81)

SD, standard deviation; DFI, DNA fragmentation index.

Tabla 2. Características generales de las muestras de semen fresco (n = 63) [6].

En comparación con las muestras tratadas por swim-up, el índice de fragmentación fue significativamente menor en las muestras procesadas con el método swim-up que con la centrifugación por gradiente. En la prueba de supervivencia de los espermatozoides, la técnica swim-up se asoció con una mayor movilidad y vitalidad de los espermatozoides tras la capacitación. Sin embargo, después de 24 horas, la concentración y el porcentaje de espermatozoides supervivientes fueron significativamente menores en el grupo swim-up que en el de centrifugación por gradiente [6].

Outcomes	Post-preparation by SU	Post-preparation by DGC	P-value
Concentration, $\times 10^6/\text{mL}$	14.29 ± 7.64	24.33 ± 10.36	<0.001
Sperm vitality, %			
0 hour	95.70 ± 3.09	90.90 ± 4.61	<0.001
24 hours	57.25 ± 19.82	66.16 ± 15.65	0.001
SVI	59.80 ± 20.50	72.92 ± 17.47	<0.001
Progressive motility, %			
0 hour	90.63 ± 4.36	85.11 ± 5.22	<0.001
24 hours	29.37 ± 16.58	38.25 ± 12.59	<0.001
SMI	32.40 ± 18.19	45.07 ± 15.02	<0.001

Data are presented as mean \pm standard deviation.

P-value: SU vs. DGC.

SU, swim-up; DGC, density gradient centrifugation; SVI, sperm vitality index; SMI, sperm motility index.

Tabla 3. Resultados de las técnicas de SU y DGC (n = 63) [6].

Outcomes	n	DFI (%)		P-value
		Post-preparation by SU	Post-preparation by DGC	
DFI, %				
DFI < 30	45	5.33 ± 4.17	8.18 ± 3.78	<0.001
DFI \geq 30	18	8.28 ± 4.76	8.83 ± 3.47	0.532
Sperm progressive motility				
Normal progressive motility	32	4.63 ± 3.18	7.66 ± 3.33	<0.001
Abnormal progressive motility	31	7.77 ± 5.14	9.10 ± 3.93	0.057
Sperm morphology				
Normal morphology	37	5.65 ± 4.11	7.38 ± 3.55	0.014
Abnormal morphology	26	6.92 ± 5.01	9.50 ± 3.67	0.001

Data are presented as mean \pm standard deviation. P-value: SU vs. DGC.

DFI, DNA fragmentation index; SU, swim-up; DGC, density gradient centrifugation.

Tabla 4. Comparación del DFI, la motilidad progresiva de los espermatozoides y la morfología de los espermatozoides después de utilizar las técnicas SU y DGC (n = 63) [6].

Estos resultados mostraron también un empeoramiento del índice de fragmentación en el grupo de mayor edad y los beneficios de la centrifugación sobre el ADN espermático se vieron comprometidos. Esto consolida las evidencias actuales que sugieren que tanto el envejecimiento paterno como el materno, afectan críticamente al éxito reproductivo [11]. Esta afirmación viene reforzada por un estudio descriptivo retrospectivo realizado sobre 2681 pacientes masculinos a los que se les realizó un análisis de semen correlacionando la edad con los parámetros espermáticos, demostrando la relación existente entre la edad y el riesgo de presentar volúmenes anómalos, aumentando siempre este riesgo con la edad. Demuestran que los varones mayores de 50 años fueron significativamente más propensos a presentar anomalías en el volumen del semen, en la concentración de los espermatozoides y en la fragmentación del ADN espermático. Cuando la concentración fue constante, se observaron más anomalías en el volumen y en la motilidad a medida que aumentaba la edad, y cuando la motilidad fue constante, los volúmenes normales del semen disminuyeron a medida que aumentó la edad. Esto se relaciona con la fragmentación, puesto que el riesgo de presentar niveles anómalos de fragmentación del ADN aumenta también con la edad [12]. La relación entre edad y fragmentación también se correlaciona con la formación de blastocistos y la tasa de abortos espontáneos. Otro estudio muestra menores tasas de formación de blastocistos a partir de la FIV cuando los varones tenían altos niveles de fragmentación del ADN espermático y observa mayores tasas de aborto espontáneo en las parejas con varones de más de 40 años. Estos resultados refuerzan la necesidad de informar a las parejas con varones de más de 40 años sobre los riesgos potenciales inherentes al tratamiento de fertilidad [9].

	Group 1 Age ≤39 years normal DNA fragmentation	Group 2 Age ≤39 years altered DNA fragmentation	Group 3 Age ≥40 years normal DNA fragmentation	Group 4 Age ≥40 years altered DNA fragmentation
N	52	32	49	30
Mean male age	35.9±2.8 ^a	35.7±2.6 ^a	45.6±3.9 ^b	46.4±3.4 ^b
Normal viscosity	30/52 (58%)	16/32 (50%)	27/49 (55%)	16/30 (53%)
Volume (ml)	3.1±1.8	3.4±1.8	2.9±1.9	2.8±1.9
Concentration (10 ⁶ spz/mL) [±]	62.3±55.5	73.6±52.1	69.7±52.0	63.7±56.2
Total count (10 ⁶ spz) [±]	192.5±143.7	232.4±161.1	220.9±196.3	195.6±163.8
Progressive spermatozoa (%)	44.9±19.9	44.6±16.5	45.2±21.9	45.9±23.2
Vitality (%)	74.1±11.0	73.8±10.1	74.5±13.2	71.9±15.1
Normal sperm morphology (%)	7.5±4.9	6.6±4.7	6.8±4.7	7.0±4.5
Concentration after processing (10 ⁶ spz/mL) [±]	65.7±30.3	67.2±32.6	65.5±38.2	67.9±31.8
Motility after processing (%)	92.9±5.3	93.1±4.1	93.9±5.2	92.9±6.1
Total count after processing (10 ⁶ spz) [±]	25.1±11.9	24.9±12.2	24.8±11.6	24.7±11.3

* spz = spermatozoa.

^{a,b}Values with different letters inside the line differ significantly ($p < 0.05$).

Tabla 5. Comparación de los parámetros del semen de los cuatro grupos de estudio. [9]

Fragmentación y calidad seminal

Existe una correlación negativa entre la fragmentación del ADN, la movilidad y la morfología de los espermatozoides en los hombres infértiles [1]. En un estudio retrospectivo en el que se analizaron a 125 pacientes infértiles se sugiere que los espermatozoides con morfología anormal son los mejores candidatos para contener daños en el ADN [8]. Cuanto mayor es la integridad del ADN espermático, mayor es la calidad del semen [7].

Fragmentación y técnicas de reproducción asistida

Numerosos estudios concluyen que un aumento de la fragmentación del ADN afecta principalmente a la fertilidad in vivo y se estima que el 40% de todos los casos de infertilidad inexplicable pueden estar relacionados con un aumento de la cantidad de fragmentación. Además, si la fragmentación del ADN supera el 30% se recomienda la inyección intracitoplásmica del espermatozoide (ICSI) como primera opción [3]. Greco et al. concluyeron que la microinyección de espermatozoides con una fragmentación de su ADN superior al 15%, valorada con TUNEL, dio lugar a una tasa de embarazo del 5,6% frente a un 44,4% cuando esta fragmentación era inferior a 6% [5]. Bungum et al. demostró que un valor del índice de fragmentación espermática superior al 30% era el umbral para un margen notable en la tasa de concepción. Cuando el valor de la fragmentación es superior al 30%, la tasa de éxito del embarazo natural y de la inseminación intrauterina era casi nula. Datos sobre la integridad del ADN de los espermatozoides muestran que el grado de fragmentación en los espermatozoides se correlaciona negativamente con la tasa de éxito de la fecundación in vitro (FIV). A pesar de esto, sigue existiendo controversia sobre el uso de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) o la FIV tradicional en pacientes con una elevada fragmentación. Sin embargo, se ha informado de que las pacientes con niveles elevados de fragmentación que recibieron ICSI tuvieron mejores tasas de fecundación, tasas de embarazo clínico y tasas de parto que las que recibieron FIV. Por lo tanto, se considera que la ICSI mejora el resultado del embarazo de las pacientes infértiles más que la FIV en el grupo de alta fragmentación. Esto puede deberse a que el ciclo de ICSI es más selectivo para los espermatozoides con forma normal y movimiento rápido [7]. La fragmentación de ADN espermático afecta de forma directa a la tasa de blastulación, así lo demostró un estudio que manifestó la existencia de la correlación negativa entre ambas. Los niveles elevados de fragmentación del ADN se asociaron con tasas bajas de blastulación y de embarazo (por transferencia), aunque la tasa de fecundación no se vio afectada [20].

Detección de la fragmentación

El ensayo COMET alcalino mostró la mejor capacidad para predecir la infertilidad masculina, seguida del ensayo TUNEL y el ensayo SCSA, mientras que el ensayo COMET neutro no tuvo poder predictivo.

Tratamiento de la fragmentación

Una investigación evaluó la relación entre la ingesta de antioxidantes en la dieta y los parámetros de la calidad del semen. Los resultados mostraron que los hombres a los que se les administró β -caroteno y vitamina C tenían menos probabilidades de presentar fragmentación espermática [7]. Un estudio de cohorte no controlado de seis hombres obesos con infertilidad inexplicable demostró que un programa dietético dirigido por un nutricionista y asociado al ejercicio durante un periodo de 3 a 8 meses pudo ayudar a reducir los valores de fragmentación, en este estudio, las parejas consiguieron partos a término tras esta intervención [2]. El tratamiento del varicocele es otra forma de disminuir el índice de fragmentación, así lo muestra una revisión sistemática que incluyó 21 estudios y 1270 hombres infértiles [2].

DISCUSIÓN

El índice de fragmentación del ADN espermático (DFI) se considera una medida clave para evaluar la fertilidad masculina, pero el valor predictivo del DFI para los resultados de la tecnología de reproducción asistida sigue siendo objeto de debate [16]. Con el desarrollo de la tecnología de reproducción asistida, el análisis de semen tradicional no ha logrado satisfacer las necesidades de la práctica clínica reproductiva. Necesitamos mejores indicadores clínicos para determinar la causa de la infertilidad masculina y su relación con los resultados reproductivos. El índice de fragmentación del ADN espermático refleja la integridad y el daño del ADN, el material genético de los espermatozoides, detectando así posibles daños espermáticos y considerándose un indicador crucial para evaluar la calidad del semen. La fragmentación del ADN espermático tiene importantes repercusiones en la fecundación, el desarrollo embrionario y la transmisión de la información genética paterna tanto en los embarazos espontáneos como en las TRA. Algunos estudios [4, 7] han demostrado que la evaluación de la fragmentación del ADN espermático es una herramienta muy valiosa para evaluar la infertilidad masculina, pero se desconoce su importancia clínica para predecir los resultados pronósticos de las TRA.

Una de las razones de la inconsistencia de la literatura es la variedad de métodos utilizados para detectar el FDS en los diferentes estudios.

Las directrices de la Asociación Europea de Urología (EAU) de 2020 sobre la infertilidad masculina recomiendan la prueba de la fragmentación del ADN espermático en hombres con infertilidad inexplicada [2]. Las pruebas del índice de fragmentación pueden tener valor no sólo en las parejas que experimentan fracasos inexplicables de la inseminación intrauterina, sino también en aquellas que están a punto de embarcarse en este tipo de tratamiento.

Teniendo todo esto en cuenta, ¿por qué la prueba de fragmentación del ADN espermático no es una herramienta de diagnóstico estándar en el tratamiento del paciente de fertilidad masculino?

Aunque el área de la fragmentación del ADN en los espermatozoides es muy relevante en las clínicas de fertilidad, persiste la necesidad de realizar más estudios centrados en la estandarización de los métodos y la aplicación clínica, así como en otros estudios centrados en la aclaración de la etiología de la fragmentación, por lo que las pruebas de fragmentación del ADN deberían formar parte del diagnóstico rutinario de la infertilidad masculina, aunque, a pesar del esfuerzo realizado en las últimas dos décadas, todavía queda un largo camino por recorrer en el campo de la fragmentación del ADN espermático [3].

Deberían iniciarse colaboraciones internacionales para desarrollar protocolos acordados y establecer umbrales. Otra cuestión de interés que deberá investigarse más a fondo es la capacidad de reparación del ovocito de los espermatozoides dañados. Se trata de un tema de interés crucial, ya que un ADN no reparado o mal reparado puede dar lugar a problemas indeseables de escisión y desarrollo del embrión. Por tanto, sería beneficioso una mejor caracterización de la actividad enzimática implicada en estos mecanismos de reparación, ya que puede representar un proceso muy sensible en el que pueden surgir alteraciones en la integridad genética del gameto masculino y persistir hasta el espermatozoide maduro [5]. Es necesario desarrollar una prueba que prediga la reparabilidad de la fragmentación del ADN espermático.

Asociación con técnicas de reproducción asistida

Hasta el 30% de las mujeres que se someten a la ICSI no tienen problemas detectables, es posible que sean fértiles y que sus ovocitos tengan más capacidad para reparar los daños en el ADN aunque el espermatozoide inyectado sea de mala calidad.

Este argumento está respaldado por Meseguer et al., que demostraron que los ovocitos de alta calidad de las donantes pueden compensar el impacto negativo del daño en el ADN del espermatozoide en el embarazo.

Además, en la ICSI, los gametos no se someten a un cultivo prolongado, por lo que, los espermatozoides pueden tener menos daños en el momento de la fecundación que los expuestos a la incubación en medios de cultivo, como en los procedimientos de FIV. Aunque las razones de la reducción de las tasas de embarazo entre las parejas de FIV/ICSI con fragmentación elevada no se entienden del todo, los factores genéticos y epigenéticos relacionados con la cromatina espermática deteriorada podrían explicar los resultados reproductivos subóptimos. El daño oxidativo del ADN puede causar mutaciones o desregular los procesos de metilación y las vías genéticas críticas para el desarrollo y la implantación del embrión. Entre los candidatos a la ICSI con una fragmentación elevada, el uso de espermatozoides testiculares en lugar de espermatozoides eyaculados se asocia con valores de fragmentación más bajos y mejores resultados reproductivos.

Evaluación de parámetros seminales

Dada la notable asociación entre las condiciones de infertilidad masculina y la fragmentación, sigue siendo esencial una evaluación andrológica completa para identificar las causas de la infertilidad y permitir que el tratamiento mejore las posibilidades de lograr una concepción natural o asistida potencialmente. Es necesario seguir investigando para determinar el papel exacto de las intervenciones médicas y quirúrgicas para los hombres subfértiles con niveles seminales anormales de fragmentación del ADN espermático [13].

La alta frecuencia de aneuploidía y fragmentación del ADN espermático podría contribuir a una baja tasa de fertilización y a un mal resultado del embarazo. Se ha observado una relación significativa entre la aneuploidía espermática y la fragmentación del ADN [13].

El volumen de semen, la concentración de esperma, el recuento total de espermatozoides y la motilidad del esperma se ha demostrado que se relaciona negativamente con la edad, es aconsejable evaluar la fragmentación espermática a los hombres que buscan un tratamiento de reproducción, ya que puede causar infertilidad y aumentar las tasas de aborto espontáneo [12].

Tratamiento de la fragmentación

Una forma de disminuir el daño en el ADN de los espermatozoides es realizar cambios en el estilo de vida, como evitar el tabaquismo, los contaminantes y los factores que aumentan el estrés oxidativo. Estos podrían ayudar a aumentar las tasas de éxito reproductivo en este grupo de pacientes. Sin embargo, es necesario identificar un método fiable para tratar las muestras de semen con altos niveles de fragmentación del ADN.

La terapia antioxidante podría ser una opción para tratar a los hombres con daños en el espermatozoides. La evaluación de la FSH, la LH y la testosterona también es útil en el tratamiento de la infertilidad masculina. La FSH es necesaria para el inicio de la espermatogénesis y la maduración de los espermatozoides.

Indicadores de la fragmentación

En los hombres infértiles, una mayor concentración de FSH se considera un indicador fiable de daño epitelial, y se ha demostrado que se asocia a la oligozoospermia grave. El aumento de los niveles séricos de gonadotropinas podría haber perturbado el proceso espermatogénico, lo que habría provocado la disminución del recuento de espermatozoides y la infertilidad. La determinación de las hormonas (FSH, LH, Prolactina, Testosterona) de los hombres infértiles es un paso importante para predecir la infertilidad [1].

El desarrollo y actualización de la tecnología de detección de la fragmentación ayuda a profundizar en el conocimiento de la misma. Sin embargo, la inclusión de la detección rutinaria de fragmentación espermática necesita una mayor revisión. Los métodos de análisis de daños en el ADN de los espermatozoides no tienen niveles de corte claramente estandarizados y cada método tiene sus ventajas e inconvenientes, por lo que es difícil proclamar uno como método universalmente preferible.

El sistema reproductivo humano es complejo, lo que hace imposible predecir el resultado de las interacciones dinámicas entre varios factores que pueden perturbar la fertilidad utilizando una sola prueba. Por lo tanto, lo mejor es seleccionar un método de prueba basado en las características clínicas y los objetivos del paciente. Dado que las pruebas de daños en el ADN de los espermatozoides proporcionan información genética de las células reproductoras masculinas, en contraste con la simple información que proporcionan los parámetros de análisis de calidad seminal.

En el futuro deberían realizarse más investigaciones sobre los métodos de selección de espermatozoides con ADN no dañado en las técnicas de reproducción asistida (TRA). Además, los médicos e investigadores que trabajan con TRA deben seguir esforzándose por obtener espermatozoides sanos con integridad del ADN nuclear para minimizar los efectos adversos que puedan surgir en la descendencia concebida a partir de espermatozoides con daños en el ADN [15]. Los efectos de los principales métodos de capacitación y selección espermática, en cuanto a la reducción del porcentaje de fragmentación, parecen ser diferentes según el método que se utilice para evaluar esta fragmentación. No obstante, la literatura más reciente afirma que cualquier tipo de selección puede ser beneficiosa en términos de reducción de la fragmentación del ADN.

El perfil seminal habitual se ha utilizado para diagnosticar la infertilidad masculina basándose en un examen de las muestras de semen. Sin embargo, la fragmentación del ADN de los espermatozoides también se ha relacionado de forma causal con el fracaso reproductivo, lo que sugiere que debería evaluarse como parte de las evaluaciones de la infertilidad masculina.

Aunque se ha examinado ampliamente la utilización de varios enfoques para estudiar el daño del ADN espermático, pocos informes han estudiado la utilidad clínica y las relaciones entre las técnicas más reconocidas de forma exhaustiva. Se puede concluir que, aparte del ensayo COMET, las cuatro estrategias restantes son productivas para distinguir entre pacientes fértiles e infértiles, siendo el ensayo COMET alcalino el mejor predictor de la infertilidad masculina [10]. En la actualidad sigue sin poderse establecer cuál es la prueba de fragmentación más informativa para los diferentes escenarios clínicos, dilucidar los mecanismos exactos de las roturas de ADN de los espermatozoides de cadena simple y doble inducidas por la oxidación y estudiar más a fondo sus efectos en los resultados reproductivos, estudiar el impacto psicológico de una fragmentación elevada en los hombres que buscan la fertilidad, aclarar el papel del grado del varicocele en la fragmentación, y el papel de la reparación del varicocele para reducir la misma y los efectos en los resultados reproductivos, estudiar el efecto de la reparación del varicocele sobre los resultados reproductivos en hombres infértiles con varicocele clínico, fragmentación elevada y parámetros seminales rutinarios dentro de los rangos normales, estudiar el impacto de las intervenciones en el estilo de vida sobre la calidad del ADN espermático y su impacto en los resultados reproductivos, aclarar el papel de la terapia antioxidante para los hombres con fragmentación, estudiar el papel de los crioprotectores y las técnicas de criopreservación para proteger a los espermatozoides del daño del ADN.

CONCLUSIONES

La infertilidad es un problema de pareja, por lo tanto, una sola prueba a un solo miembro de la pareja es limitada para predecir el resultado del tratamiento. Además, la edad de la pareja masculina debe ser tomada en cuenta tanto como la de la mujer.

Aunque las pruebas de fragmentación no sustituyen a las herramientas actuales para el diagnóstico de la infertilidad, pueden añadir información independiente sobre la calidad del espermatozoa, y su integración en las clínicas de reproducción puede proporcionar un mejor asesoramiento, diagnóstico y planificación del tratamiento, puesto que puede ser de ayuda para elegir una u otra técnica dentro del procedimiento.

Es por eso que, la fragmentación del ADN espermático debería considerarse durante la evaluación de la calidad del semen.

En cuanto a la detección de la fragmentación del ADN, las técnicas con mayor capacidad de predicción son el ensayo COMET y el TUNEL.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zeqiraj A, Beadini S, Beadini N, Aliu H, Gashi Z, Elezaj S, et al. Male infertility and sperm DNA fragmentation. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 2018; 6(8): 1342–5.
2. Esteves SC, Zini A, Coward RM, Evenson DP, Gosálvez J, Lewis SEM, et al. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia* [Internet]. 2021; 53(2): 3874.
3. Rex AS, Aagaard J, Fedder J. DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology* [Internet]. 2017; 5(4): 622–30.
4. Tímermans A, Vázquez R, Otero F, Gosálvez J, Johnston S, Fernández JL. DNA fragmentation of human spermatozoa: Simple assessment of single- and double-strand

- DNA breaks and their respective dynamic behavioral response. *Andrology* [Internet]. 2020; 8(5): 1287–303.
5. González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012; 13(11): 14026–52.
 6. Le MT, Dang HNT, Van Nguyen T, Nguyen TTT, Nguyen QHV, Cao NT. Effects of sperm preparation techniques on sperm survivability and DNA fragmentation. *J Int Med Res* [Internet]. 2022; 50(5).
 7. Qiu Y, Yang H, Li C, Xu C. Progress in research on sperm DNA fragmentation. *Med Sci Monit* [Internet]. 2020; 26: e918746.
 8. Ferrigno A, Ruvolo G, Capra G, Serra N, Bosco L. Correlation between the DNA fragmentation index (DFI) and sperm morphology of infertile patients. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2021; 38(4): 979–86.
 9. Martínez E, Bezazián C, Bezazián A, Lindl K, Peliquero A, Cattaneo A, et al. Sperm DNA fragmentation and male age: results of in vitro fertilization treatments. *JBRA Assist Reprod* [Internet]. 2021; 25(4): 533–9.
 10. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clin Exp Reprod Med* [Internet]. 2019; 46(1): 14–21.
 11. Albani E, Castellano S, Gurrieri B, Arruzzolo L, Negri L, Borroni EM, et al. Male age: negative impact on sperm DNA fragmentation. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2019; 11(9): 2749–61.
 12. Pino V, Sanz A, Valdés N, Crosby J, Mackenna A. The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *JBRA Assist Reprod* [Internet]. 2020; 24(1): 82–6.

13. Arumugam M, Shetty DP, Kadandale JS, Nalilu SK. Association of sperm aneuploidy frequency and DNA fragmentation index in infertile men. *J Reprod Infertil*. 2019; 20(3): 121–6.
14. Kim GY. What should be done for men with sperm DNA fragmentation? *Clin Exp Reprod Med [Internet]*. 2018; 45(3): 101–9.
15. Esteves SC, Santi D, Simoni M. An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrology [Internet]*. 2020;8(1):53–81.
16. Yang H, Li G, Jin H, Guo Y, Sun Y. The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. *Transl Androl Urol [Internet]*. 2019; 8(4): 356–65.
17. Hasanen E, Elqusi K, ElTanbouly S, Hussin AE, AlKhadr H, Zaki H, et al. PICSI vs. MACS for abnormal sperm DNA fragmentation ICSI cases: a prospective randomized trial. *J Assist Reprod Genet [Internet]*. 2020; 37(10): 2605–13.
18. Campos LGA, Requejo LC, Miñano CAR, Orrego JD, Loyaga EC, Cornejo LG. Correlation between sperm DNA fragmentation index and semen parameters in 418 men seen at a fertility center. *JBRA Assist Reprod [Internet]*. 2021; 25(3): 349–57.
19. Chen L, Fang J, Jiang W, Wang J, Li D. Effects of the sperm DNA fragmentation index on the clinical and neonatal outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles. *J Ovarian Res [Internet]*. 2020; 13(1): 52.
20. Alvarez Sedó C, Bilinski M, Lorenzi D, Uriondo H, Noblía F, Longobucco V, et al. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA Assist Reprod [Internet]*. 2017; 21(4): 343–50.