

Comparación entre el test de fragmentación de ADN espermático mediante la técnica de SCD y el índice de vitalidad medida con el test de naranja de acridina

Leonor Ortega López, Enrique Olaya Vila, Patricia López Domínguez, Aurora Gabriel Segovia, Iván Orozco Gómez, Rocío Núñez Calonge y Pedro Caballero Peregrín

Laboratorio de Andrología. Clínica Tambre. Madrid. España.

RESUMEN

Introducción: La integridad del ADN espermático es uno de los factores más importantes que se analizan actualmente en el estudio de fertilidad masculina.

Hay numerosas publicaciones sobre la utilidad de diversos métodos en los cuales se analiza el estado de la cromatina espermática. Uno de los más sencillos es el test de bromuro de etidio y naranja de acridina (AO), con el cual se comprueba el grado de desnaturalización del ADN espermático en función de su unión al colorante naranja de acridina. Sin embargo, la técnica de AO está limitada a estas propiedades metacromáticas, por cuanto nos aporta información limitada del estatus nuclear del espermatozoide.

Otras técnicas, como el *sperm chromatin dispersion* (SCD) analizan la fragmentación del ADN espermático comprobando roturas en la cadena.

Objetivo: En nuestro estudio se intenta observar si hay correlación entre la vitalidad del espermatozoide mediante el test vital de AO-bromuro de etidio con la fragmentación del ADN medida mediante el test SCD. En ambos casos se trata de un sistema visual de análisis.

Material y métodos: Para el estudio se han incluido 82 muestras de semen de varones en estudio de fertilidad en la Clínica Tambre.

Para la vitalidad se ha empleado el test de bromuro de etidio AO y para la fragmentación espermática el test SCD (Halosperm, Halotech).

La técnica de AO detecta la proporción de espermatozoides muertos dependiendo del grado de desnaturalización del ADN nuclear. Espermatozoides con fluorescencia naranja indican un ADN desnaturalizado, mientras que los que presentan fluorescencia verde contienen el ADN intacto.

ABSTRACT

Comparison between the sperm DNA fragmentation test using the sperm chromatin dispersion technique and the vitality index measured with the acridine orange test

Introduction: Sperm DNA integrity is one of the most important factors currently analyzed in the study of male fertility. There are numerous publications on the utility of diverse methods analyzing sperm chromatin status. One of the simplest is the ethidium bromide/acridine orange (AO) test, which assesses the degree of sperm DNA denaturation according to its binding to acridine orange staining. However, the AO test is limited to these metachromatic properties and consequently provides limited information on the nuclear status of the sperm. Other techniques, such as the sperm chromatin dispersion (SCD) test, analyze sperm DNA fragmentation by assessing DNA strand breaks.

Objective: To analyze whether there is a correlation between sperm vitality measured through the ethidium bromide/AO test and DNA fragmentation measured through the SCD test. In both cases, the samples were analyzed visually.

Material and methods: Eighty-two semen samples from men undergoing fertility testing in the Clínica Tambre were included in this study. The ethidium bromide/AO test was used to test sperm vitality and the SCD test (Halosperm, Halotech) was used to evaluate sperm DNA fragmentation. The AO technique detects the proportion of dead sperm, depending on the degree

Correspondencia: Dra. L. Ortega López.
Laboratorio de Andrología. Clínica Tambre.
Tambre, 8. 28002 Madrid. España.
Correo electrónico: lortega@clinicatambre.com

El porcentaje de fragmentación se midió mediante el test SCD mejorado (Halosperm). Este test nos indica la presencia de roturas de la cadena de ADN basándonos en el tamaño del halo obtenido. En un espermatozoide fragmentado no observaremos este halo al analizar la muestra con microscopio de fluorescencia y el fluorocromo GelRed y, por el contrario, un espermatozoide con el ADN no fragmentado presenta un halo mayor.

Se utilizó la *t* de Student para comparación estática de medias entre ambos grupos. Se ha considerado como significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados: La proporción de espermatozoides con ADN desnaturizado detectado con el test de AO se correlacionó significativamente con la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado, detectado con el test SCD ($r = 0,5$; $p < 0,001$). El valor medio del índice de vitalidad con AO fue de 20,93% (6 ± 50) frente al 28,35% ($7,3 \pm 40$) de índice de fragmentación en las 82 muestras analizadas.

Además, también se correlaciona positivamente el valor de los espermatozoides con ADN fragmentado o desnaturizado con la movilidad.

Por otra parte, los 2 ensayos mostraron una correlación estadísticamente negativa con la concentración espermática.

Discusión: Este estudio demuestra la correlación entre los resultados de vitalidad espermática medida con el test de AO y el grado de fragmentación de ADN con el SCD. Estos resultados sugieren que podría utilizarse el test de AO como primera opción para determinar el daño espermático de la cromatina antes de la realización de tests más costosos o complicados.

Palabras clave: Fragmentación ADN. Vitalidad. Naranja de acridina-bromuro de etidio. SCD.

of nuclear DNA denaturation. Sperm with orange fluorescence indicate denatured DNA, while those with green fluorescence contain intact DNA.

The percentage of fragmentation was measured by the improved SCD test (Halosperm). This test indicates DNA strand breaks based on the size of the halo obtained. In fragmented sperm, no halo is observed when the sample is examined with a fluorescence microscope and GelRed fluorochrome. Sperm with intact DNA show a halo.

Student's *t*-test was used to compare the means between the two groups. Differences of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results: The proportion of sperm with denatured DNA detected with the AO test was significantly correlated with the proportion of sperm DNA fragmentation detected with the SCD test ($r = 0.5$, $P < 0.001$). In the 82 samples analyzed, the mean vitality index with the AO test was 20.93% (6 ± 50) versus 28.35% (7.3 ± 40) for the fragmentation index. The proportion of sperm with denatured or fragmented DNA was also positively correlated with motility. The two assays showed a statistically significant negative correlation with sperm concentration.

Discussion: This study demonstrates a correlation between the results of sperm vitality measured by the AO test and the degree of DNA fragmentation measured by the SCD test. These results suggest that the AO test could be the first option to determine sperm chromatin damage before more expensive or complicated tests are performed.

Key words: DNA fragmentation. Vitality. Ethidium bromide/acridine orange. SCD.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se está intentando profundizar en el estudio de la fertilidad masculina. Dentro de este campo, el área que más auge tiene en este momento es el estudio de la integridad de la molécula del ADN en el espermatozoide¹⁻⁵. Se trata de un parámetro que en principio se piensa que no está correlacionado o que es independiente de los parámetros que analizamos de forma rutinaria en el laboratorio, y puede ser que tenga efectos directos en la fecundación. Hay estudios que demuestran una relación con los parámetros rutinarios^{6,7}. Todos consideran que es importante realizar esta prueba de forma complementaria en pacientes que tengan algún parámetro alterado.

El ADN del espermatozoide se encuentra unas 6 veces más compactado que el del cromosoma mitótico. Esta compactación en bucles es posible gracias a la acción de las protaminas intercaladas, que sustituyen a las histonas (proteínas asociadas al ADN en las etapas

iniciales de la espermatogénesis formando los clásicos nucleosomas), las cuales estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas⁸. Esta compactación es importante para proteger al genoma espermático de agentes externos como el estrés oxidativo, el paso a través del epidídimo o el tracto reproductivo femenino, ya que una matriz nuclear estable es crucial en la participación del desarrollo embrionario y errores en la organización del material genómico pueden producir un serio impacto en el principio del desarrollo.

Los mecanismos que producen el daño están en parte identificados, pero la procedencia del daño, una vez que éste se localiza en el espermatozoide maduro no se puede identificar con facilidad. Se han propuesto 3 hipótesis principales que explicarían la presencia de ADN fragmentado en el espermatozoide.

En la primera se relaciona la existencia de roturas en la cadena del ADN en células maduras con el intercambio del complejo de histonas por el de prota-

minas que ocurre en el proceso de la espermiogénesis⁹. Este intercambio, dirigido a conseguir una mayor compactación de la molécula de ADN, genera cierto nivel de estrés en la torsión de la molécula de ADN, dado que existe un súper-enrollamiento heredado de la presencia de histonas. Para eliminar este tipo de tensiones y facilitar el reemplazamiento de las histonas por protaminas se genera un cierto nivel de roturas en las moléculas de ADN que serán posteriormente reparadas¹⁰.

La segunda hipótesis implica al proceso apoptótico. Con el concurso de enzimas nucleolíticas se generarían roturas de cadena doble en la molécula de ADN¹¹⁻¹³, de manera similar a lo que puede ocurrir en las células somáticas¹⁴. La tercera hipótesis propone que la fragmentación del ADN es la consecuencia de un exceso de estrés oxidativo en el tracto reproductivo masculino. Los altos valores de especies reactivas de oxígeno (ROS) podrían ser consecuencia de su liberación por los leucocitos activados y/o macrófagos, por ejemplo, frente a una respuesta inflamatoria generada ante un proceso infeccioso. La presencia de células inmaduras en el eyaculado y que mantienen cantidades excesivas de citoplasma, como por ejemplo la presencia de gotas citoplasmáticas proximales o distales¹⁵⁻¹⁹, pueden también contribuir a provocar altos valores de oxidación de tipo endógeno en este caso. El estrés oxidativo puede desencadenarse cuando la producción de ROS supera la actividad de los agentes antioxidantes presentes en el plasma seminal, incluyendo enzimas tales como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa, así como agentes que bloquean la cascada de reacciones redox. Normalmente, este tipo de daño suele generar daños en las bases y roturas en una de las 2 hebras de la doble cadena del ADN.

Finalmente, debemos tener en cuenta que la presencia de ADN fragmentado en un espermatozoide maduro puede ser el resultado de procesos combinados, dado que los mecanismos propuestos en las 3 hipótesis no son excluyentes y lo más probable es que no operen como fenómenos aislados. Por ejemplo, se podría asumir que el proceso apoptótico y el daño generado por ROS puedan estar asociados y lo mismo podría ocurrir tras un proceso de espermiogénesis anormal con acumulación de roturas, hecho que podría ser detectado por el proceso de señalización de la apoptosis. Adicionalmente a todo este tipo de procesos en los que se produce un incremento en las tasas basales de daño espermático, el manejo de los espermatozoides de forma extracorporal puede generar también cierto daño en el ADN.

Hay diferentes metodologías para analizar la fragmentación del ADN. Estas técnicas las podemos

dividir en 2 grupos, en el primero estarían las técnicas que marcan las roturas del ADN, porque incorporan moléculas marcadas con fluorocromos a los extremos de rotura como son TUNEL (*terminal d-utp nick-end labeling*)²⁰ e ISNT (*in situ nick translation*)¹⁴. El segundo incluye técnicas basadas en la capacidad de desnaturalización del ADN debido a las roturas de sus cadenas y frente a determinados tratamientos, en este grupo incluimos SCSA (*sperm chromatin structure assay*)²¹⁻²³, DBD-FISH (*DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization*)²⁴, COMETA²⁵⁻²⁷ y SCD (*sperm chromatin dispersión*).

Además, también hay otros métodos como el AO (naranja de acridina) o el TB (azul de toluidina)^{28,29} basados en propiedades metacromáticas.

– SCD. Se fundamenta en la compactación del ADN por acción de las protaminas y las relaciones de puentes disulfuro que se establecen entre ellas. Analiza la diferente descondensación de la cromatina al tratarse con un medio ácido seguido de una desproteínización rompiendo los enlaces disulfuro y relajando la molécula de ADN formando un halo de dispersión alrededor de la estructura nuclear central.

Observaremos diferentes tipos de halos, ya que el ADN no fragmentado producirá un halo de dispersión mayor que corresponde a los bucles de ADN mientras que el ADN fragmentado ve impedida la liberación de estos bucles dando lugar a halos de menor dispersión. Valoraremos el tamaño de estos halos de dispersión de la cromatina mediante microscopia, ya sea de fluorescencia o de campo claro.

La ventaja y a su vez desventaja es que los resultados no necesitan medir colores o intensidades de fluorescencia y, por tanto, tampoco necesitan de un equipo complejo como el citómetro de flujo ni personal especializado. Por el contrario, la determinación del resultado por distintos observadores puede introducir muchos errores, ya que es una interpretación subjetiva^{30,31}.

– AO. El tipo de fluorescencia emitida por el AO depende de la existencia de tioles/disulfuros presentes en las protaminas nucleares que se asocian al ADN. Dicho fluorocromo se intercala en la doble hélice de ADN (asociada a protaminas ricas en enlaces disulfuro) como monómero generando una fluorescencia verde. Tras la desnaturalización de la doble hélice (asociada a protaminas ricas en enlaces tioles), el AO se une formando agregados, generando una fluorescencia naranja.

Es una de las metodologías alternativas nombradas anteriormente³². Utiliza el mismo principio del SCSA, ambos están basados en la susceptibilidad del ADN

nuclear espermático en condiciones ácidas y las propiedades metacromáticas del AO, pero el resultado se observa en microscopia de fluorescencia. Aquí es donde radica el mayor problema de esta técnica, que es la subjetividad de la persona que evalúa la muestra, ya que hay toda una serie de tonalidades intermedias entre el verde y el naranja. Esto también ayuda a que los resultados no sean muy reproducibles y no distingue entre pacientes fértiles e infértiles³³. En cambio otros autores indican que sí existen diferencias en los valores de AO en grupos con baja fertilidad y grupos control³⁴. Como ya hemos dicho es una simplificación del método SCSA que no requiere ni citómetro de flujo ni a una persona experimentada, aunque esta técnica tiene un valor predictivo comprometido.

Estas metodologías son variadas, cada una tiene ventajas y desventajas dependiendo del lugar en el que vayamos a utilizarlas. Han sido y siguen siendo punto de mira y de crítica por diversos autores, y hay numerosos estudios en los que se compara su eficacia. Por ejemplo, el de Erenpreiss et al, 2004 en el que comparan la técnica de TB con el SCSA y el TUNEL²⁸, o el de Donald y Evenson, 2005²⁹ donde se compara el SCD con el SCSA, entre otros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio hemos analizado 82 muestras de semen de pacientes en estudio de fertilidad de la clínica Tambre. En los 82 casos se analizaron los siguientes parámetros: concentración, movilidad, vitalidad espermática y fragmentación del ADN. Estos parámetros se midieron tras un tiempo licuefacción/licuación medio de 30 min. La concentración y la movilidad se valoran, para tener un conocimiento previo de la muestra a evaluar.

Para la concentración utilizamos una cámara Makler®. En ella colocamos 6 µl del eyaculado con el cubreobjetos y dejamos atemperar en la platina calefactada durante 1 min. El recuento lo realizamos en un microscopio de contraste de fases a 20×, siendo el procedimiento ideal de barrido el de zig-zag. La cámara Makler consta de 100 cuadraditos (10 × 10), contamos 10 de esos cuadraditos, ya sea en horizontal, vertical o en diagonal. Lo ideal es contar unas 3 veces los 10 cuadraditos y hacer una media. Este resultado se traduce en millones de spz/ml.

En la valoración de la movilidad tenemos que distinguir un aspecto cuantitativo, o porcentaje de espermatozoides con movilidad, y un aspecto cualitativo, o velocidad y direccionalidad de los espermatozoides móviles. La evaluación de la movilidad espermática a través de la observación directa con el microscopio

óptico tiene un *handicap* importante a tener en cuenta, que es la objetividad, ya que la subjetividad de la observación por el operador puede distorsionar el resultado del análisis. Para su realización se colocan 6 µl del eyaculado en la cámara Makler y tras el minuto en la platina calefactada procedemos a valorar la movilidad en el microscopio óptico con objetivo de 20×. El recuento lo realizamos en un total de 100 spz y los dividimos en 4 categorías:

- Movilidad activa de grado 3 o categoría a: el movimiento espermático de traslación es rápido, rectilíneo y cuantitativamente más importante que el desplazamiento lateral de la cabeza.

- Movilidad activa de grado 2 o categoría b: el movimiento espermático de traslación es progresivo, pero cuantitativamente menor que en la movilidad activa de grado 3 y con frecuencia no rectilíneo.

- Movilidad activa de grado 1 o categoría c: el movimiento de traslación es mínimo o inexistente, y de amplitud semejante al desplazamiento lateral de la cabeza y la cola.

- Movilidad de grado 0 o categoría d: son espermatozoides inmóviles.

La OMS 1999 aconseja aceptar una muestra de semen como normal cuando al menos el 50% de los espermatozoides están dotados de movilidad progresiva (tipo a + tipo b) o cuando haya más de un 25% de tipo a. Se denomina astenozoospermico cuando no se cumple este requisito de movilidad. Actualmente, estos valores han variado debido a la revisión realizada recientemente OMS 2010, pero en el momento del estudio éstos fueron los parámetros establecidos.

Vitalidad. Para la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos se utilizó la tinción de AO-bromuro de etidio que requiere de microscopio de fluorescencia con filtro (Nikon B2A).

Colocamos sobre un portaobjetos una proporción 1:1 (v/v) de semen y la solución de AO-bromuro de etidio. Colocamos un cubreobjetos y procedemos a la lectura lo más rápido posible, ya que el porcentaje de los espermatozoides con ADN desnaturalizado aumenta conforme aumenta el tiempo de exposición. El recuento se realizó en 100 espermatozoides con objetivo 40×.

Se considera un eyaculado normal cuando hay más del 75% de espermatozoides sin teñir de color naranja.

Fragmentación. La fragmentación la medimos mediante el test SCD (Halosperm; Halotech-DNA S.L., Madrid, España).

Las muestras de semen se diluyeron con PBS (tampon fosfato salino) hasta alcanzar una concentración de entre 5 y 10 millones de espermatozoides por ml. A continuación se procesa con el kit SCD y para realizar la lectura de las muestras una vez secas se puede proceder de 2 formas: teñir los portaobjetos con Diff-Quick y observarlo en microscopio de campo claro, o con microscopio de fluorescencia añadiendo un fluorocromo. En nuestro caso, las muestras una vez procesadas se tiñeron con fluorocromo GelRed, y el recuento se realizó en 300 espermatozoides en un microscopio de fluorescencia con objetivo de 40X. Este fluorocromo es muy sensible, extremadamente estable y poco contaminante para el medio ambiente. Está diseñado para reemplazar el bromuro de etidio que es muy tóxico y sirve para teñir el ADN, ya sea de simple o doble cadena, y el ARN en geles de agarosa.

En cada muestra contabilizamos los espermatozoides en 3 grupos:

– Espermatozoides con halo grande y mediano: el grosor del halo es \geq a la longitud del diámetro menor del *core*.

– Espermatozoides con halo pequeño: el grosor del halo es \leq que un tercio del diámetro menor del *core*, pudiendo ser de forma irregular o prácticamente inapreciable.

– Espermatozoides sin halo y degradados: los que sin mostrar halo presentan el *core* fragmentado en gránulos o muestran una tinción muy débil.

La suma de los 2 últimos grupos nos da el valor del índice de fragmentación. Tras esta observación asumimos que los espermatozoides que contienen ADN fragmentado son los que no presentan halo de dispersión.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como medias \pm desviación típica.

Se utilizó el test de la t de Student para estudiar la relación con las variables dicotómicas o nominales, y el ANOVA con las variables métricas. Una diferencia de $p < 0,05$ se ha considerado como estadísticamente significativa.

Para la elaboración de la base de datos se utilizó Microsoft Excel, para el análisis estadístico el paquete SPSS for Windows 11.5 y la representación gráfica de los resultados se realizó con Apple grapher 2.0 para la elaboración de las curvas de regresión logística.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados de concentración espermática, movilidad total, porcentaje de espermatozoides muertos (valorados con AO) e índice de fragmentación de los 82 casos expresados como media \pm desviación típica.

El porcentaje de espermatozoides con el ADN desnaturizado (muertos) y con ADN fragmentado se correlaciona significativamente ($r = 0,5$; $p < 0,001$) (fig. 1).

También se ha identificado una relación entre el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado y la tasa de inmóviles ($r = 0,303$; $p < 0,005$) (fig. 2) y una correlación entre los espermatozoides con ADN desnaturizado y los inmóviles ($r = 0,306$; $p < 0,005$) (fig. 3).

No se ha encontrado correlación entre el porcentaje de espermatozoides fragmentados o desnaturizados con la concentración espermática.

DISCUSIÓN

En este estudio hemos identificado importantes correlaciones entre calidad de semen, evaluada por los parámetros convencionales (concentración y movilidad), y marcadores de la integridad de ADN: estructura de la cromatina espermática y fragmentación. En este sentido se ha comprobado que hay una estrecha correlación entre los 2 tests y la movilidad espermática, pero no con la concentración. Podemos aventurar que la asociación entre estas 2 pruebas de ADN y la movilidad espermática, en realidad, reflejan las propiedades de estos tests de función que, aunque miden características diferentes, están estrechamente relacionadas con la integridad del ADN espermático.

Por otra parte, la correlación encontrada entre el test de AO, que mide desnaturización del ADN, y el

TABLA 1. Resultados de los 82 casos*

	Concentración ($\times 10^6/ml$)	Movilidad (a + b + c, %)	Muertos (AO, %)	Índice de fragmentación (SCD, %)
n = 82	45,57 \pm 33,38	52,75 \pm 16,42	20,93 \pm 10,58	28,35 \pm 9,35

AO: test de naranja de acridina; SCD: *sperm chromatin dispersion*.

*Resultados expresados como media \pm desviación típica.

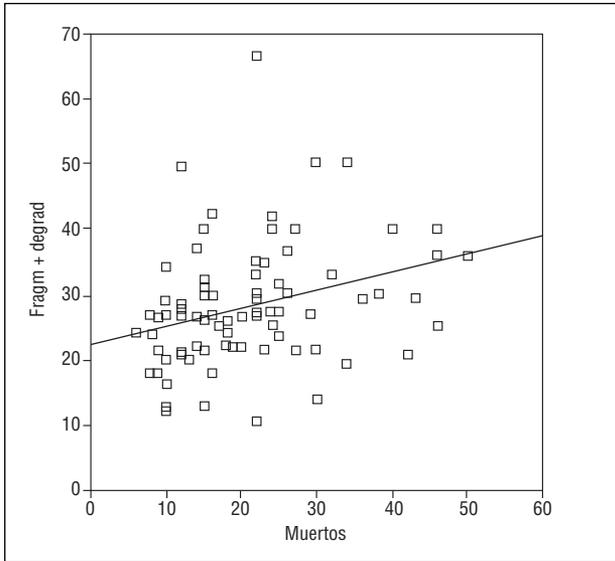


Figura 1. Correlación entre el porcentaje de espermatozoides con anomalías de ADN medido con el test de fragmentación Halosperm y con naranja de acridina.

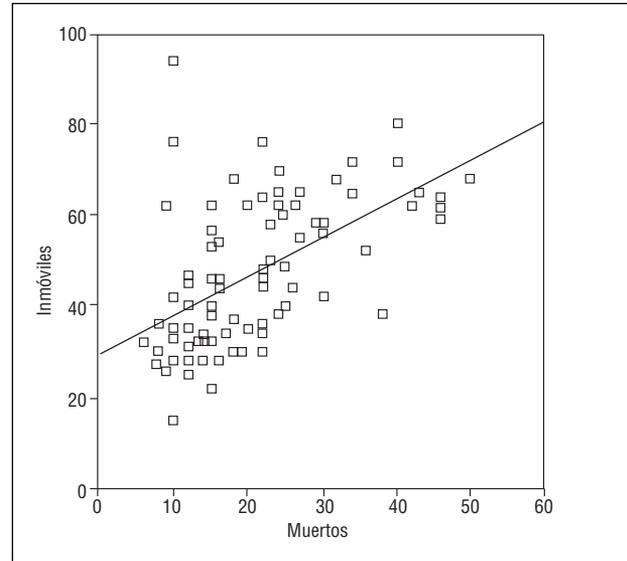


Figura 3. Correlación entre el porcentaje de espermatozoides inmóviles y con anomalías de ADN (medido con el test naranja de acridina).

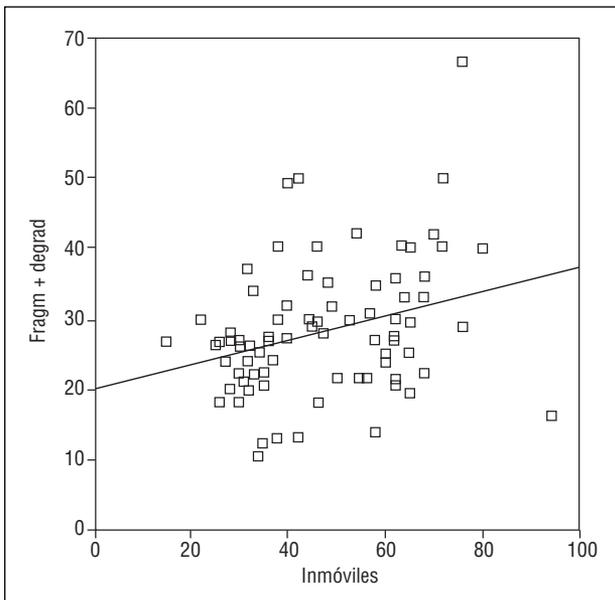


Figura 2. Correlación entre el porcentaje de espermatozoides inmóviles y con anomalías de ADN (medido con el test de fragmentación Halosperm).

de fragmentación, que mide roturas en las cadenas, aunque lógica, ha sido muy discutida en diferentes publicaciones. Las principales razones de discusión se basan en la poca fiabilidad que ofrece el test de AO^{35,36} debido a su falta de subjetividad: problemas con la rápida evolución hacia espermatozoides muertos por la fluorescencia y tinciones heterogéneas. Estas dificultades han limitado la aplicación de rutina de

esta técnica en los estudios diagnósticos de evaluación de la fertilidad masculina³⁷. Para solucionar estos problemas, Evenson (1980)²¹ desarrolló el test de SCSA, que es similar al de AO, pero ofrece resultados más objetivos ya que utiliza citometría de flujo.

Ya que la utilización de la técnica de TUNEL que detecta daño endógeno de ADN se ha considerado la más exacta para cuantificar roturas en las cadenas de ADN de los espermatozoides³⁸, se han realizado estudios para comparar la técnica de TUNEL con la de SCSA³⁹, comprobándose que los resultados que muestran son similares.

Más adelante se desarrolló el SCD, que analiza la diferente descondensación de la cromatina al tratarse con un medio ácido, seguido de una desproteínización, rompiendo los enlaces disulfuro y relajando la molécula de ADN, formando un halo de dispersión alrededor de la estructura central³⁰. Posteriormente, en el 2005, estos mismos autores publicaron una adaptación de este test: el Halosperm, el cual, basándose en las mismas propiedades es de fácil realización en la rutina del laboratorio³¹.

Los resultados obtenidos con este trabajo, con el cual se demuestra la correlación existente entre estas 2 pruebas de estudio de ADN, nos pueden servir para reforzar la importancia del test de AO como rutina del laboratorio de andrología. Esta prueba, que es fácil y barata, no necesita observadores experimentados, pero sin embargo nos proporciona una información muy útil de cara al factor pronóstico de infertilidad masculina.

Pacientes con resultados de necrozoospermia en función del test de desnaturalización de ADN deberían, por tanto, ser candidatos a realizarse un análisis más profundo de fragmentación de ADN, que nos aporte más información respecto a la integridad nuclear.

Sin embargo, el valor de estos tests de integridad de ADN se debe evaluar con los mismos criterios que cualquier prueba diagnóstica, utilizando una combinación de parámetros estadísticos y juicio clínico. Está claro que uno de los condicionantes para el éxito en la reproducción humana depende de la integridad del ADN. Además, parece también que está claro que roturas en la cadena de ADN pueden influir en el desarrollo embrionario y como consecuencia en la consecución de embarazo. Sin embargo, todavía no es del todo conocido cómo estas técnicas, que miden la integridad de la molécula del ADN, pueden ayudarnos a identificar problemas de fertilidad y cómo afectan a la posibilidad de gestación en reproducción asistida.

Se necesitan estudios adicionales que definan mejor el valor clínico de las pruebas de daño espermático del ADN, y el test que pueda resultar más apropiado para utilizarse en esta comprobación.

Bibliografía

1. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003;9:331-5.
2. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril*. 2005;84:850-3.
3. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure. Assay for fertility assessment. En: *Current Protocols in Cytometry* [publicación online]; 2001.
4. Fraser L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male fertility. *Pol J Vet Sci*. 2004;7:311-21.
5. Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M, Bujan L. Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol Obstet Fertil*. 2005;33:89-101.
6. Dorado Silva M, Migueles B, González M, Hebles M, Aguilera L, Sánchez P, et al. Relación entre los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático. *Rev Int Androl*. 2008;6:14-7.
7. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménéz YJR, Clement P, Hamidi J, BenKhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril*. 2009;91:1801-5.
8. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*. 1991;44:569-74.
9. 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;16:80-7.
10. McPherson SM, Longo FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol*. 1993;158:122-30.
11. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*. 2002;66:1061-7.
12. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:428-32.
13. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton JE, Mascha MA, Abdel-Hafez AJ, Thomas, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*. 2004;19:129-38.
14. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research*. 1993;207:202-5.
15. Gil-Guzmán EG, Ollero M, López MC, Sharma RK, Álvarez JG, Thomas AJ, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*. 2001;16:1922-30.
16. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2002;78:1215-24.
17. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:641-50.
18. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79:829-43.
19. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*. 2004;25:5-18.
20. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl*. 2000;21:903-12.
21. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation in mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Scienc*. 1980;210:1131-3.
22. Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev*. 1999;11:1-15.
23. Evenson DP, Larson KJ, Lost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002;23:25-43.
24. Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Días J, De la Torre J, et al. DNA breakage detection - FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res*. 2000;453:77-82.
25. Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res*. 1997;236:231-7.
26. Collins AR. The Comet Assay: principles, applications, and limitations. *Methods in Molecular Biology*. 2002;203:163-7.
27. Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Human Reprod*. 1996;2:613-9.
28. Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa Je, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Human Reproduction*. 2004;19:2277-82.
29. Andreetta AM, Stockert JC, Barrera C. A simple method to detect sperm chromatin abnormalities: cytochemical mechanism and possible value in predicting semen quality in assisted reproductive procedures. *Int J Androl*. 1995;18 Suppl 1:23-8.
30. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Álvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003;24:59-66.
31. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril*. 2005;84:833-42.
32. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*. 1984;42:87-91.
33. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrel DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*. 2006;27:53-9.
34. Gopalkrishnan K, Hurkadli K, Padwal V, Balaiah D. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human sperm

- matozoa in diferent groups of infertility men. *Andrología*. 1999;31:277-82.
35. Duran EH, Gurgan T, Gunlalp S, Engisu ME, Yarali H, Ayhan A. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Hum Reprod*. 1998;13:1235-9.
 36. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Parris K, et al. Utility of the sperm chromatin assays as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14:1039-49.
 37. Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, et al. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol*. 2003;518: 253-68.
 38. Young KE, Robbins WA, Xun L, Elashoff D, Rothman SA, Perreault SD. Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. *J Androl*. 2003;24:853-61.
 39. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and Sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2003;80:895-902.