



Revista Internacional de Andrología

www.elsevier.es/andrologia



ORIGINAL

Estudio de la dinámica de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en jóvenes varones



Laura Sarabia-Cos^{a,b}, Julián J. Arense-Gonzalo^b, Lidia Mínguez-Alarcón^b,
Jaime Gosálvez^c, Jaime Mendiola^{b,d,*} y Alberto M. Torres-Cantero^{b,d,e,f}

^a Departamento de Biología de la Reproducción, Centro de Reproducción Asistida Quirón Dexeus Murcia, Murcia, España

^b Departamento de Ciencias Sociosanitarias, Área de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria-Virgen de la Arrixaca, Murcia, España

^c Unidad de Genética, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

^d Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

^e Campus Regional de Excelencia Mare Nostrum, Universidad de Murcia, Murcia, España

^f Servicio de Medicina Preventiva, Hospital General Universitario Reina Sofía, Murcia, España

Recibido el 15 de julio de 2014; aceptado el 4 de agosto de 2014

Disponible en Internet el 17 de diciembre de 2014

PALABRAS CLAVE

Ácido
desoxirribonucleico;
Dinámica de
fragmentación;
Espermatozoide

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio es describir y analizar los niveles basales y la dinámica de fragmentación del ADN espermático tras la eyaculación en varones jóvenes.

Material y método: Se trata de un estudio transversal realizado en jóvenes universitarios sanos ($n = 114$) de la Región de Murcia entre 2010 y 2011. La fragmentación del ADN espermático (SDF) se definió como el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado con respecto al total de los espermatozoides analizados. Se calcularon las tasas de incremento de fragmentación (rSDF) por tramos de incubación utilizando el test de dispersión de la cromatina espermática. Se estudiaron los valores basales de la SDF, así como los valores tras la incubación de las muestras a 37 °C durante 2,5, 17 y 24 h. Los análisis estadísticos se realizaron mediante pruebas paramétricas y no paramétricas.

Resultados: El SDF basal medio obtenido fue de 27,2% (DE 14,4), y la rSDF fue significativamente mayor durante el primer intervalo de incubación comparada con los valores obtenidos en los siguientes intervalos. La tasa de degradación durante las primeras 2,5 h (5,5%/h) resultó significativamente mayor en aquellas muestras con un nivel de fragmentación basal superior al 30%.

Conclusiones: Observamos unos valores medios de SDF basal relativamente altos comparados con los de otros estudios publicados y corroboramos que la rSDF es mayor durante las primeras horas tras la eyaculación. Por otra parte, las muestras con SDF basal superior al 30%

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jaime.mendiola@um.es (J. Mendiola).

KEYWORDS

Desoxyrribonucleic acid;
Dynamics of fragmentation;
Sperm

presentan mayor rSDF durante las primeras horas de incubación comparadas con muestras con niveles basales inferiores al 15%.

© 2014 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Study of dynamics of sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in young men

Abstract

Objective: To describe and analyze sperm DNA fragmentation and its dynamics after ejaculation in young men.

Material and method: This is a cross-sectional study conducted between 2010 and 2011 in young university students (n = 114) from the Murcia Region (Spain). Sperm DNA fragmentation index (SDF) was defined as the percentage of sperm with fragmented DNA divided by the total amount of assessed sperm. The rate of sperm DNA fragmentation (rSDF) was determined by periods of incubation according to the sperm chromatin dispersion test. SDF and its dynamics were evaluated after incubation for 2.5, 17 and 24 h at 37 °C. Parametric and non-parametric tests were used for statistical analyses.

Results: Mean basal SDF was 27.2% (SD 14.4) and rSDF was significantly higher in the first period of incubation compared to the following periods of incubations. The rate of sperm DNA degradation during the first 2.5 h (5.5%/h) was significantly higher in those samples with a basal SDF above 30%.

Conclusions: These results indicate that our mean values of SDF are relatively higher compared to other published studies and corroborate that rSDF is significantly higher during the first hours after ejaculation. Moreover, samples with basal SDF above 30% showed higher rSDF during the first hours of incubation compared to the samples with basal SDF below 15%.

© 2014 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Se estima que un 15% de las parejas en edad reproductiva presentan problemas de fertilidad¹, y alrededor de un 50% de los casos se debe a un factor masculino². La infertilidad de origen masculino se ha diagnosticado tradicionalmente mediante el estudio de la concentración, la movilidad y la morfología espermática, y estos parámetros son esenciales para evaluar la calidad seminal humana².

Se ha propuesto que el estudio de la fragmentación del ADN espermático (SDF) podría ser una herramienta útil complementaria a los parámetros seminales clásicos para valorar el potencial fértil de los varones³. La integridad del ADN espermático es un factor crítico para la correcta transmisión de la información genética paterna al embrión⁴, de tal forma que la molécula de ADN en el espermatozoide podría comprometer el éxito reproductivo^{5,6}. El daño en el ADN espermático tiene consecuencias negativas para la fertilidad, tanto a la hora de conseguir la implantación embrionaria como para el desarrollo fetal posterior^{7,8}. El elevado daño en el ADN de los espermatozoides se ha asociado a bajas tasas de fecundación e implantación, y a un aumento en la tasa de abortos y la incidencia de enfermedades en los niños nacidos^{6,7,9}.

La mayoría de los estudios que analizan la SDF valoran este daño como el porcentaje de espermatozoides que tienen la molécula de ADN dañada en un momento

determinado^{8,9}. Sin embargo, trabajos recientes indican que la SDF es un fenómeno dinámico, ya que tras la eyaculación la fragmentación tiende a aumentar con el tiempo¹⁰ y es un fenómeno que afecta a todas las especies de mamíferos y que parece correlacionarse, entre otros factores, con el tipo y la calidad de la protaminación¹¹⁻¹³. De hecho, diversos trabajos han explorado o evaluado la dinámica de la fragmentación espermática como herramienta coadyuvante en el estudio de la infertilidad masculina^{10,11,14,15}. La mayoría de estos trabajos se llevaron a cabo con pacientes infértiles que acudían a clínicas de fertilidad y con donantes de semen con fertilidad contrastada^{10,11,14-17}.

No obstante, hasta donde conocemos, ningún estudio previo ha explorado este fenómeno en varones jóvenes sanos o población no seleccionada sin conocimiento de su calidad seminal o fertilidad. Por tanto, nuestro objetivo es describir y analizar los niveles basales y la dinámica de la SDF tras la eyaculación en varones jóvenes.

Material y método

Este trabajo se engloba dentro del Estudio de hombres jóvenes de Murcia (Murcia Young Men's Study). La metodología se ha descrito y publicado previamente¹⁸. Brevemente, se distribuyeron anuncios por todos los campus universitarios invitando a los estudiantes a participar en este proyecto con

el mensaje: «Se buscan hombres jóvenes sanos universitarios para proyecto de investigación». Para ser incluidos en el Murcia Young Men's Study los sujetos tenían que ser estudiantes universitarios, nacidos en España después del 31 de diciembre de 1987, y poder contactar con sus madres para que estas cumplimentaran un cuestionario. El estudio se llevó a cabo analizando muestras seminales procedentes de jóvenes universitarios voluntarios y sanos (entre 18-23 años) de la Región de Murcia entre 2010 y 2011. El presente trabajo comprende un total de 114 sujetos para los que se disponía de todos los datos y variables necesarias para este estudio –calidad seminal, SDF y características demográficas–. Los participantes fueron recompensados por su participación con una tarjeta regalo de 50 €. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos participantes, y la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia aprobó este estudio.

Análisis seminal

La obtención de la muestra se realizó mediante masturbación en el propio centro. El tiempo de abstinencia se registró como el número de horas desde la obtención de la muestra hasta la eyaculación anterior. Los análisis de parámetros seminales (volumen, concentración, recuento total, movilidad y morfología espermática) se realizaron siguiendo las recomendaciones de la OMS (2010)². Brevemente, el volumen eyaculado fue estimado a partir del peso de la muestra, asumiendo una densidad del semen de 1,0 g/mL. La concentración espermática fue evaluada utilizando un hemocitómetro (Improved Neubauer; Hausser Scientific Inc., Horsham, PA, EE. UU.). Los espermatozoides fueron clasificados según si eran móviles o inmóviles para establecer el porcentaje de los primeros (con movimiento progresivo y no progresivo)². El recuento espermático total se calculó como el producto entre el volumen y la concentración espermática. La morfología se evaluó usando la tinción de Papanicolaou y el criterio estricto de Kruger¹⁹. La misma embrióloga especializada llevó a cabo todos los análisis espermáticos.

Examen físico

El índice de masa corporal se calculó como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros. Se evaluó el tamaño testicular usando un orquidómetro de Prader (Andrology Australia, Clayton, Victoria, Australia) y la presencia o no de varicocele u otras anomalías escrotales.

Análisis de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático

Para el estudio de la dinámica, una vez licuada la muestra, se separaron distintas alícuotas que fueron incubadas a 37 °C durante distintos periodos de tiempo antes de ser congeladas. Los periodos de tiempo fueron los siguientes: a tiempo 0 h (valor basal de fragmentación), a 2,5, a 17 y a 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las alícuotas fueron congeladas directamente sin crioprotector a

–20 °C, y posteriormente a –80 °C. El análisis de la SDF se realizó mediante el test de dispersión de la cromatina espermática (SCD), utilizando el Dyn-Halosperm® (Halotech S. L., Madrid, España)²⁰. Las muestras se descongelaron mediante inmersión 30 s en agua a 37 °C, y se diluyeron hasta obtener una concentración aproximada de 15 millones/mL. Las muestras fueron procesadas inmediatamente tras su descongelación. Las muestras procesadas se analizaron utilizando microscopía de fluorescencia (SYBR® Green II RNA Gel Stain, Invitrogen™, Life Technologies Corporation, Paisley, Reino Unido) y se contabilizaron por el mismo observador. El índice de fragmentación (SDF) se definió como el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado con respecto al total de los espermatozoides analizados. Para cada alícuota se estudiaron 300 espermatozoides. La tasa de fragmentación del ADN espermático (rSDF, del inglés *rateSDF*) se definió como el incremento de la SDF por unidad de tiempo evaluado en horas.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis descriptivos sobre las características demográficas, el examen físico, la calidad seminal, el SDF y la rSDF. Tras comprobar la normalidad de las variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, se usaron indistintamente pruebas paramétricas (t de Student) y no paramétricas (Mann-Whitney) para la comparación de medias entre 2 grupos. Del mismo modo, para la comparación de medias entre varios grupos se utilizó ANOVA (Kruskal-Wallis en variables no normales) y la prueba post-hoc de Games-Howell (Mann-Whitney). Todas las pruebas fueron de 2 colas, y el nivel de significación estadística se fijó en 0,05. Para la realización de los análisis estadísticos se empleó el paquete SPSS® 20.0 (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE. UU.).

Resultados

En la [tabla 1](#) se muestran las principales características de los sujetos participantes en este trabajo (n=114). El 36,6% eran fumadores habituales y un 7% presentaron varicocele. La mayoría presentaba un buen estado de salud general. El tiempo medio de abstinencia fue de 78,7 h (desviación estándar [DE] 35,3), y el tiempo transcurrido desde la obtención hasta el análisis de la muestra fue de 39,8 min (DE 12,3). La concentración espermática media fue de 51,2 millones/mL (DE 35,7), y el porcentaje de espermatozoides móviles totales fue de 56,5% (DE 9,1). El porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales fue de 10,3% (DE 6,4). El 82,5% de las muestras analizadas presentó todos los parámetros dentro de la normalidad según la OMS². En la [tabla 1](#) también podemos observar la distribución de los individuos en 3 grupos en función de los valores basales de SDF observados.

El porcentaje de fragmentación en cada periodo de tiempo y las tasas de degradación se muestran en la [tabla 2](#). El SDF basal medio fue de 27,2% (DE 14,4). Los resultados en el análisis dinámico de la SDF (rSDF) muestran que durante la incubación de las muestras se produce un incremento en la SDF. La tasa de fragmentación (4,0%/h) fue significativamente mayor durante el primer intervalo de incubación

Tabla 1 Características principales de los sujetos participantes en este trabajo

	Media (DE)	Mediana (p25-p75)
Demográficas		
Edad (años)	20,0 (1,3)	20,0 (19,0-21,0)
Índice de masa corporal (kg/m ²)	23,8 (1,3)	23,4 (21,6-25,3)
Tiempo de abstinencia (h)	78,7 (35,3)	71,0 (59,7-93,0)
Tiempo desde la obtención hasta el procesamiento (min)	39,8 (12,3)	35,0 (30,0-45,0)
Tamaño del testículo izquierdo (mL)	20,6 (3,4)	20,0 (19,0-23,0)
Tamaño del testículo derecho (mL)	21,9 (3,4)	22,0 (20,0-25,0)
Fumadores, n (%)	41 (36,6)	
Varicocele, n (%)	8 (7,0)	
Parámetros seminales		
Volumen seminal (mL)	3,4 (1,9)	3,0 (2,1-4,1)
Concentración (millones/mL)	51,2 (35,7)	43,4 (22,8-71,1)
Motilidad (% motiles)	56,5 (9,1)	56,7 (52,0-62,0)
Morfología (% normal)	10,3 (6,4)	9,0 (5,7-14,0)
Recuento total (millones)	156,6 (114,1)	135,3 (69,7-223,7)
Normozoospermicos, n (%)	94 (82,5)	
Fragmentación de ADN espermático		
SDF basal inferior a 15%, n (%)	22 (19,3)	
SDF basal del 15-30%, n (%)	50 (43,9)	
SDF basal superior a 30%, n (%)	42 (36,8)	

ADN: ácido desoxirribonucleico; DE: desviación estándar; p25: percentil 25; p75: percentil 75; SDF: fragmentación del ADN espermático.

Tabla 2 Características principales de los análisis de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático y sus tasas de degradación en los sujetos participantes en este trabajo

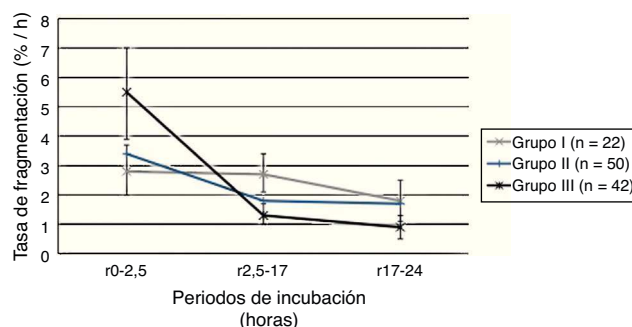
Fragmentación de ADN espermático	Media (DE)	Mediana (p25-p75)
SDF ₀ (basal)	27,2 (14,4)	23,9 (17,0-34,1)
SDF _{2,5}	37,1 (19,3)	32,7 (21,6-47,5)
SDF ₁₇	63,5 (19,9)	64,4 (48,8-80,0)
SDF ₂₄	73,5 (18,0)	76,0 (60,0-87,8)
Tasa de fragmentación		
rSDF _{0-2,5}	4,0 (3,9) ^a	2,9 (1,2-5,0)
rSDF _{2,5-17}	1,8 (1,3)	1,7 (0,7-2,8)
rSDF ₁₇₋₂₄	1,4 (1,6)	1,1 (0,3-2,4)
rSDF ₀₋₂₄	1,9 (0,8)	1,9 (1,3-2,5)

ADN: ácido desoxirribonucleico; DE: desviación estándar; p25: percentil 25; p75: percentil 75; rSDF_{0-2,5}: tasa de fragmentación entre las 0 y las 2,5 h; rSDF_{2,5-17}: tasa de fragmentación entre las 2,5 y las 17 h; rSDF₁₇₋₂₄: tasa de fragmentación entre las 17 y las 24 h; rSDF₀₋₂₄: tasa de fragmentación entre las 0 y las 24 h; SDF_t: índice de fragmentación del ADN espermático a las «t» horas.

^a Prueba U de Mann-Whitney: rSDF_{0-2,5} significativamente superior a rSDF_{2,5-17}, rSDF₁₇₋₂₄ y rSDF₀₋₂₄ ($p < 0,05$).

comparada con los valores obtenidos en el segundo y tercer intervalo (1,8 y 1,4%/h, respectivamente).

En la [tabla 3](#) se muestran los valores de la rSDF en función de la SDF basal. Como se puede observar, existen diferencias significativas entre los distintos grupos. La tasa de degradación durante el primer intervalo resulta significativamente mayor en aquellas muestras con un nivel de fragmentación basal superior al 30% (tasa 5,5%/h) comparada con las

**Figura 1** Tasa de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en los distintos intervalos de incubación en función de la fragmentación basal.

muestras con un nivel basal de fragmentación menor (tasa 2,8%/h). A mayor fragmentación basal, mayor velocidad de fragmentación durante las primeras horas de incubación. En la [figura 1](#) se representa la rSDF en los distintos periodos de incubación en función de la SDF basal.

Discusión

En general, los estudios que hacen referencia a los niveles de fragmentación en el ADN del espermatozoide utilizan muestras procedentes de clínicas con fallos de reproducción asociados a los pacientes o bien son donantes seleccionados basándose en una serie de criterios de calidad espermática, genética y morfológica. Hasta donde conocemos, este es el primer estudio que describe y analiza los niveles tanto del daño basal como del dinámico en el ADN de los espermatozoides en una muestra amplia de jóvenes varones sanos.

Tabla 3 Relación entre la fragmentación basal y la dinámica de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático

SDF basal	Tasa de fragmentación de ADN espermático (%/h)															
	rSDF _{0-2,5} ^a				rSDF _{2,5-17} ^b				rSDF ₁₇₋₂₄ ^c				rSDF ₀₋₂₄ ^d			
	M	DE	IC 95%		M	DE	IC 95%		M	DE	IC 95%		M	DE	IC 95%	
Grupo I: SDF basal inferior a 15%	2,8	2,0	2,0	3,7	2,7	1,5	2,1	3,4	1,8	1,6	1,1	2,5	2,5	0,7	2,2	2,8
Grupo II: SDF basal entre 15-30%	3,4	3,5	2,4	4,4	1,8	1,2	1,5	2,2	1,7	1,8	1,2	2,2	2,0	0,8	1,7	2,2
Grupo III: SDF basal superior a 30%	5,5	4,8	3,9	7,0	1,3	1,1	1,0	1,7	0,9	1,3	0,5	1,3	1,6	0,6	1,4	1,8

ADN: ácido desoxirribonucleico; DE: desviación estándar; IC 95%: intervalo de confianza del 95%; M: media; rSDF_{0-2,5}: tasa de fragmentación entre las 0 y las 2,5 h; rSDF_{2,5-17}: tasa de fragmentación entre las 2,5 y las 17 h; rSDF₁₇₋₂₄: tasa de fragmentación entre las 17 y las 24 h; rSDF₀₋₂₄: tasa de fragmentación entre las 0 y las 24 h; SDF: fragmentación del ADN espermático.

Se aplicó ANOVA (con prueba post-hoc de Games-Howell) para la comparación de rSDF_{2,5-17}, rSDF₁₇₋₂₄ y rSDF₀₋₂₄ en cada uno de los grupos definidos según fragmentación basal del individuo.

Para rSDF_{0-2,5} se usó la prueba de Kruskal-Wallis.

^a Significativamente menor en el Grupo I respecto al Grupo III.

^b Significativamente mayor en el Grupo I respecto a los Grupos II y III.

^c Significativamente menor en el Grupo III respecto a los Grupos I y II.

^d Significativamente mayor en el Grupo I respecto a los Grupos II y III.

Según nuestros resultados, la SDF basal media observada en nuestra población de estudio es relativamente alta comparada con los resultados publicados sobre donantes jóvenes. Los SDF observados en jóvenes varones, normozoospermicos y con fertilidad probada suelen oscilar entre el 10-15%^{10,14}, mientras que en nuestro trabajo el SDF medio es del 27,3%. Debemos tener en cuenta que aunque los individuos de nuestro estudio son jóvenes sanos y, la mayoría, normozoospermicos (82,5%), a diferencia de los donantes de semen utilizados en la mayor parte de los trabajos, no presentan fertilidad probada. No obstante, nuestros resultados en cuanto a fragmentación basal son similares a los publicados en un estudio realizado en pacientes normozoospermicos que acudían a clínicas de fertilidad²¹, aunque otros trabajos con pacientes similares obtienen índices de fragmentación inferiores²². Evidentemente, los estudios de prevalencia del daño registrado en el ADN del espermatozoide en población humana requieren de la inclusión de un tamaño poblacional mayor para considerarlos como indicativos de la situación real. No obstante, en la mejor situación que podríamos considerar bajo la que asumir unos niveles de daño en el ADN bajos, que sería una población de donantes, los niveles detectados utilizando la misma técnica de evaluación están en torno al 10%^{10,14}. Las diferencias con la población aquí analizada son altamente significativas. Quizás esta situación sea mucho más real de lo que imaginamos, dado que si bien no existen datos bien contrastados sobre este particular, se estima que tan solo sobre un 10-15% de los individuos que acuden para ser seleccionados como posibles donantes de semen son seleccionados como tales. De hecho, si tomamos como referencia los valores de corte establecidos por Gosálvez et al.¹⁴ para los donantes en nuestra población, tan solo un 3,5% cumplirían esta condición.

En nuestro trabajo utilizamos el test de SCD, el cual ha sido estudiado y analizado con respecto a otras técnicas disponibles, concluyendo que los resultados obtenidos con él son comparables a los obtenidos con el *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling* o el *sperm chromatin structure assay*²³. Por otra parte, otros trabajos han analizado los puntos de corte, la sensibilidad

y la especificidad obtenidos con el test SCD, y muestran que el test presenta una buena capacidad para determinar o diagnosticar la infertilidad masculina^{8,20,23}. Otro punto importante en la metodología de nuestro trabajo es la congelación de las muestras seminales. Algunos autores no encontraron diferencias en la fragmentación entre muestras de semen congeladas y no congeladas¹⁴, aunque un trabajo reciente indica un incremento del 10% en roturas de cadena simple en muestras previamente criopreservadas²⁴. Sin embargo, en la literatura encontramos resultados dispares, por ejemplo, algunos trabajos muestran un incremento en el daño del ADN espermático debido a la criopreservación²⁵, mientras que otros estudios sostienen que la congelación no produce ningún efecto²⁶. El principal problema es que muchos de estos estudios están realizados con diferentes técnicas analíticas moleculares, lo cual limita la comparabilidad de los resultados.

Nuestros resultados sobre la dinámica de la fragmentación del ADN espermático (rSDF) concuerdan con lo publicado hasta la fecha, ya que la fragmentación aumenta tras la eyaculación cuando incubamos las muestras de semen a 37 °C, y este incremento en la fragmentación es característico de cada individuo^{10,11,14,15,17,27}. Estudios realizados en humanos y otros mamíferos señalan que la rSDF es característica de cada especie¹¹. No obstante, entre individuos de una misma especie también se observan diferentes patrones de rSDF. Este incremento diferencial del daño asociado al individuo puede presentar modelos de crecimiento tanto de tipo exponencial como logarítmico¹⁰.

Nuestros resultados coinciden con otros estudios realizados en donantes fértiles, que nos muestran que la rSDF es mayor durante las primeras horas de incubación¹⁰. En general, se observa que a medida que aumenta el tiempo de incubación, aumenta la fragmentación de las muestras y la tasa de degradación se atenúa. La rSDF media durante las primeras horas de incubación obtenida en nuestro trabajo es inferior a la publicada en los primeros estudios sobre dinámica¹⁰, aunque es similar a la presentada en trabajos posteriores, con valores que oscilan entre el 2-4%/h^{14,16,28}. Un reciente trabajo que estudia la rSDF en

varones normozoospermicos y en donantes obtiene resultados parecidos a los nuestros, con una rSDF media $\pm$ DE en el intervalo de 0 a 2 h de $3,6 \pm 2,77$ en varones normozoospermicos, y de $1,6 \pm 1,8$ en donantes¹⁴. Este tipo de discrepancias es asumible si tenemos en cuenta las condiciones de manejo de los espermatozoides en distintos laboratorios. Es decir, la utilización o no de crioprotectores, los crioprotectores utilizados, diferencias en las rampas de temperatura aplicadas para la criopreservación, los cambios en la composición de los diluyentes seminales²⁹ y un largo etcétera de situaciones pueden provocar que la longevidad del ADN presente diferencias incluso dentro del mismo eyaculado. Pero, en general, las tendencias en las que el daño se presenta tras la incubación suelen ser asimilables a nivel de especie¹¹, ligeramente variables para cada individuo dentro de una especie¹¹, y siempre dependientes de las condiciones de manejo de las muestras seminales³⁰.

Cuando comparamos la rSDF en función de la SDF basal de las muestras encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos. Durante las 2,5 primeras horas de incubación la rSDF fue mayor en aquellas muestras con SDF superiores al 30% (Grupo III) comparadas con las muestras que presentaron valores basales inferiores al 15% (Grupo I). Podríamos decir que las muestras con mayor SDF basal presentan, además, una menor longevidad de su ADN. En otras palabras, si bien se desconocen las razones últimas de esta realidad, el ADN de individuos que presentan mayores niveles de daño basal es más vulnerable al daño iatrogénico. Nuestros resultados en este sentido concuerdan con trabajos previos donde se compara la rSDF durante las primeras horas de incubación entre pacientes y donantes de semen^{11,14}. Una posible explicación para este efecto reside en el incremento de determinadas enzimas en el medio, a medida que los espermatozoides están más afectados. Las enzimas contenidas en el acrosoma tienen características tanto lipolíticas como proteolíticas³¹, y adicionalmente determinadas ADNasas pueden también canalizar efectos de degradación del ADN espermático³².

A medida que aumenta el tiempo de incubación todos los individuos tienden a homogeneizar los valores de fragmentación. La rSDF media obtenida en nuestro estudio en el intervalo de 0 a 24 h es de $1,9 \pm 0,8\%/h$. Este valor es superior al publicado en otros trabajos, que muestran rSDF de $0,55 \pm 0,25\%/h$ ¹⁴. Hay que tener en cuenta que en nuestro análisis las muestras fueron incubadas junto con el plasma seminal, lo que puede afectar a la fragmentación final obtenida tras 24 h de incubación. Cuando comparamos la tasa de fragmentación en periodos largos de incubación entre los distintos grupos observamos diferencias significativas. En la tasa de fragmentación, en el intervalo de 0 a 24 h, el Grupo I (SDF < 15%) presenta una tasa de fragmentación significativamente mayor que los Grupos II (SDF entre 15-30%) y III (SDF > 30%) (tabla 3). Desde el punto de vista clínico, este fenómeno es interesante, puesto que 2,5 h es un tiempo que suele transcurrir desde la obtención de la muestra y su utilización. Parece aconsejable para cualquier clínica que las muestras seminales se utilicen lo más rápido posible tras su obtención, con especial atención a aquellas con alteraciones en la SDF basal. La degradación del ADN se inicia rápidamente tras la eyaculación, por lo tanto, cualquier ligero retraso podría ejercer una influencia negativa sobre el potencial fértil de la muestra. Dado que se considera

que individuos que presentan un SDF basal > 30% podrían tener mayores dificultades para conseguir un embarazo³³, es evidente que las muestras de semen que se utilizan en tratamientos de reproducción asistida, transcurridos una serie de minutos, pueden haber superado estos valores. Según nuestros resultados, un 32% (24/75) de las muestras que presentaban valores de SDF basales inferiores al 30%, transcurridas 2,5 h presentaban valores de SDF por encima del 30%. Además, desde un punto de vista clínico, y considerando la importancia de la dinámica de fragmentación, sería muy interesante realizar trabajos similares al presente pero con la muestra capacitada, como ha sido publicado por Caballero Peregrín et al.³⁴, que además se ajustaría mejor a lo que ocurre en realidad en el laboratorio de andrología.

En conclusión, observamos una fragmentación basal media relativamente alta comparada con la facilitada por otros estudios publicados, y corroboramos que la velocidad de fragmentación del ADN espermático es mayor durante las primeras horas tras la eyaculación. Por otra parte, las muestras con fragmentación basal superior a 30% presentan mayor tasa de fragmentación durante las primeras horas de incubación comparadas con muestras con niveles basales inferiores al 15%.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este estudio ha sido financiado por las siguientes entidades: Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III (PI10/00985), Fundación Séneca de la Región de Murcia (08808/PI/08) y proyecto BFU-2013-44290-R.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Hoffman BL, Williams JW. Evaluation of the infertile couple. En: Hoffman BL, Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Bradshaw KD, Cunningham FG, et al., editores. Williams Gynecology. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2012.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva, Switzerland: WHO; 2010.
- Giwerzman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: A case-control study. *Int J Androl.* 2010;33:221-7.

4. Evenson DP, Wixon R. Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 2008;90:1229–31.
5. Bungum M, Bungum L, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): A tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl*. 2011;13:69–75.
6. Zini A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57:78–85.
7. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008;23:2663–8.
8. Tandara M, Bajić A, Tandara L, Bilić-Zulle L, Sunj M, Kozina V, et al. Sperm DNA integrity testing: Big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. *Andrology*. 2014;2:678–86.
9. Bungum M, Bungum L, Lynch KF, Wedlund L, Humaidan P, Giwercman A. Spermatozoa DNA damage measured by sperm chromatin structure assay (SCSA) and birth characteristics in children conceived by IVF and ICSI. *Int J Androl*. 2012;35:485–90.
10. Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Nuñez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril*. 2009;92:170–3.
11. Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Gouraud A, Holt WV. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev*. 2011;78:951–61.
12. Nanassy L, Liu L, Griffin J, Carrell DT. The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein Pept Lett*. 2011;18:772–7.
13. Castillo J, Simon L, de Mateo S, Lewis S, Oliva R. Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *J Androl*. 2011;32:324–32.
14. Gosálvez J, García-Ochoa C, Ruiz-Jorro M, Martínez-Moya M, Sánchez-Martínez P, Caballero P. A qué velocidad «muere» el ácido desoxirribonucleico del espermatozoide tras descongelar muestras seminales procedentes de donantes. *Rev Int Androl*. 2013;11:85–93.
15. García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, et al. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril*. 2011;95:105–9.
16. García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl*. 2011;34:e546–53.
17. Abad C, Amengual MJ, Gosálvez J, Coward K, Hannaoui N, Benet J, et al. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrologia*. 2013;45:211–6.
18. Mendiola J, Jørgensen N, Mínguez-Alarcón L, Sarabia-Cos L, López-Espín JJ, Vivero-Salmerón G, et al. Sperm counts may have declined in young university students in Southern Spain. *Andrology*. 2013;1:408–13.
19. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod*. 1990;5:586–92.
20. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005;84:833–42.
21. Gosálvez J, González-Martínez M, López-Fernández C, Fernández JL, Sánchez-Martín P. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril*. 2011;96:1083–6.
22. Feijó CM, Esteves SC. Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2014;101:58–63.
23. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*. 2013;1:715–22.
24. Ribas-Maynou J, Fernández-Encinas A, García-Peiró A, Prada E, Abad C, Amengual MJ, et al. Human semen cryopreservation: A sperm DNA fragmentation study with alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*. 2014;2:83–7.
25. Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril*. 2010;93:159–66.
26. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl*. 2001;22:646–51.
27. Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez EI, Nuñez R, Fernández JL, Caballero P, López-Fernández C, et al. A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril*. 2009;92:1915–9.
28. Gosálvez J, Nuñez R, Fernández JL, López-Fernández C, Caballero P. Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. *Andrologia*. 2011;43:373–7.
29. Imrat P, Hernandez M, Ritten S, Thongtip N, Mahasawangkul S, Gosálvez J, et al. The dynamics of sperm DNA stability in Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa before and after cryopreservation. *Theriogenology*. 2012;77:998–1007.
30. López-Fernández C, Johnston SD, Fernández JL, Wilson RJ, Gosálvez J. Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm concentration. *Theriogenology*. 2010;74:1362–70.
31. Llanos MN. Acrosome reaction in mammalian spermatozoa. Biochemical aspects. *Arch Biol Med Exp (Santiago)*. 1989;22:25–36 (Spanish).
32. Sotolongo B, Lino E, Ward WS. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod*. 2003;69:2029–35.
33. Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*. 2006;65:979–91.
34. Caballero Peregrín P, Nuñez Calonge R, Ortega-López L, Pérez-Gutiérrez LM, López-Fernández C, Gosálvez Berenguer J. Dinámica diferencial de la fragmentación del ADN en espermatozoides capacitados y no capacitados: un análisis prospectivo. *Rev Int Androl*. 2008;6:186–92.