



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
BIÓLOGO**

TÍTULO

**ANÁLISIS POR EL MÉTODO SCD DEL NIVEL DE FRAGMENTACIÓN DE
ADN ESPERMÁTICO DE LA MUESTRA POBLACIONAL DE HOMBRES EN
GUAYAQUIL.**

AUTOR
DANIEL XAVIER REGATO CAJAS.

TUTOR:

ARIEL ESCOBAR

GUAYAQUIL 2018.

©Derecho de Autor

Daniel X. Regato Cajas

2018

Director de Tesis

BLGO. ARIEL ESCOBAR Msc



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD CIENCIAS NATURALES
CARRERA **BIOLOGÍA**
UNIDAD DE TITULACIÓN



ANEXO 4

Guayaquil, 5 de enero del 2018

Blga.

Mónica Armas Soto. Msc.

DIRECTOR DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA

FACULTAD CIENCIAS NATURALES

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

Ciudad.-

De mis consideraciones:

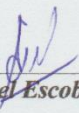
Envío a Ud. el Informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación *Análisis por el método SCD del nivel de fragmentación de ADN espermático de la muestra poblacional de hombres en Guayaquil* del estudiante **Daniel Xavier Regato Cajas**, indicando ha cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que el estudiante está apto para continuar con el proceso de revisión final.

Atentamente,


Blgo. Telmo Ariel Escobar Troya MSc

C.I. 0201316650



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD CIENCIAS NATURALES
CARRERA **BIOLOGÍA**
UNIDAD DE TITULACIÓN



ANEXO 5

RÚBRICA DE EVALUACIÓN TRABAJO DE TITULACIÓN

Título del Trabajo: *Análisis por el método SCD del nivel de fragmentación de ADN espermático de la muestra poblacional de hombres en Guayaquil*.

Autor: *Regato Cajas Daniel Xavier*

ASPECTOS EVALUADOS	PUNTAJE MÁXIMO	CALF.
ESTRUCTURA ACADÉMICA Y PEDAGÓGICA	4.5	4.5
Propuesta integrada a Dominios, Misión y Visión de la Universidad de Guayaquil.	0.3	0.3
Relación de pertinencia con las líneas y sublíneas de investigación Universidad / Facultad/ Carrera	0.4	0.4
Base conceptual que cumple con las fases de comprensión, interpretación, explicación y sistematización en la resolución de un problema.	1	1
Coherencia en relación a los modelos de actuación profesional, problemática, tensiones y tendencias de la profesión, problemas a encarar, prevenir o solucionar de acuerdo al PND-BV	1	1
Evidencia el logro de capacidades cognitivas relacionadas al modelo educativo como resultados de aprendizaje que fortalecen el perfil de la profesión	1	1
Responde como propuesta innovadora de investigación al desarrollo social o tecnológico.	0.4	0.4
Responde a un proceso de investigación – acción, como parte de la propia experiencia educativa y de los aprendizajes adquiridos durante la carrera.	0.4	0.4
RIGOR CIENTÍFICO	4.5	4.5
El título identifica de forma correcta los objetivos de la investigación	1	1
El trabajo expresa los antecedentes del tema, su importancia dentro del contexto general, del conocimiento y de la sociedad, así como del campo al que pertenece, aportando significativamente a la investigación.	1	1
El objetivo general, los objetivos específicos y el marco metodológico están en correspondencia.	1	1
El análisis de la información se relaciona con datos obtenidos y permite expresar las conclusiones en correspondencia a los objetivos específicos.	0.8	0.8
Actualización y correspondencia con el tema, de las citas y referencia bibliográfica	0.7	0.7
PERTINENCIA E IMPACTO SOCIAL	1	1
Pertinencia de la investigación	0.5	0.5
Innovación de la propuesta proponiendo una solución a un problema relacionado con el perfil de egreso profesional	0.5	0.5
CALIFICACIÓN TOTAL *	10	10
* El resultado será promediado con la calificación del Tutor Revisor y con la calificación de obtenida en la Sustentación oral.		


Blgo. Telmo Ariel Escobar Troya Msc
No. C.I.0201316650

Fecha: 20 de agosto de 2018



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD CIENCIAS NATURALES
CARRERA **BIOLOGÍA**
UNIDAD DE TITULACIÓN



ANEXO 6

CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrado TELMO ARIEL ESCOBAR TROYA, tutor del trabajo de titulación, certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por DANIEL XAVIER REGATO CAJAS, C.C.:0917180465, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de BIOLOGO.

Se informa que el trabajo de titulación: Análisis por el método SCD del nivel de fragmentación de ADN espermático de la muestra poblacional de hombres en Guayaquil, ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio **URKUND** quedando el 5 % de coincidencia.

URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document: UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL propuesta final final.docx (D40823418)
Submitted: 8/20/2018 5:10:00 PM
Submitted By: telariejies@hotmail.com
Significance: 5 %

Sources included in the report:

Informe-final-Espermatograma (1).docx (D24634877)
<https://www.reproduccionasistida.org/fragmentacion-adn-semen/>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1138359310000584>
http://libdci.fcm.unc.edu.ar/libdci/tesis/Conrado_Avenida/C3%2010.pdf
<https://www.cchri.com.mx/molimilto/4073/la-fragmentacion-mecanica-de-rotary.html>
<https://zaguan.unizar.es/record/7116/files/TA2-PFC-2012-175.pdf>
http://scielo.skl.cs/scielo.php?script=sci_arttext&pid=51561-29532017000300009
<https://eprints.ucm.es/28822/1/135786.pdf>
<https://www.efesalud.com/la-tasa-de-infertilidad-llega-al-17-por-ciento-de-la-poblacion-y-segura-al-42a/>
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048>
<https://doi.org/10.1093/hjci/jew163>
<https://www.institutobernabeu.com/foro/ccs-comprehensive-chromosome-screening-y-esterilidad-de-causa-desconocida/>
<http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/05/Libro-Resumen-Inventario-13-02-2014-prensa.pdf>
[http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=52304-51322014000100005&lng=es&nm=iso&tlng=es
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27259212>

Instances where selected sources appear:

22


Blgo. TELMO ARIEL ESCOBAR TROYA Msc
C.I. 0201316650



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD CIENCIAS NATURALES
CARRERA **BIOLOGÍA**
UNIDAD DE TITULACIÓN



ANEXO 7

Guayaquil, 31 de agosto del 2018

Blga.

Mónica Armas Soto. MSc.

DIRECTORA DE LA CARRERA BIOLOGÍA

FACULTAD CIENCIAS NATURALES

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la **REVISIÓN FINAL** del Trabajo de Titulación "Análisis por el método SCD del nivel de fragmentación de ADN espermático de la muestra poblacional de hombres en Guayaquil" del estudiante DANIEL XAVIER REGATO CAJAS. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimiento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:

- El título tiene un máximo de 20 palabras.
- La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.
- El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.
- La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.
- Los soportes teóricos son de máximo 25 años.
- La propuesta presentada es pertinente.

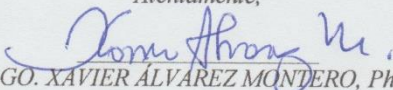
Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica el que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que el estudiante DANIEL XAVIER REGATO CAJAS está apto para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,


BLGO. XAVIER ÁLVAREZ MONTERO, Ph.D.

C.I. 0908695364



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD CIENCIAS NATURALES
CARRERA **BIOLOGÍA**
UNIDAD DE TITULACIÓN



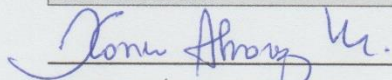
ANEXO 8

RÚBRICA DE EVALUACIÓN MEMORIA ESCRITA TRABAJO DE TITULACIÓN

Título del Trabajo: Análisis por el método SCD del nivel de fragmentación de ADN espermático de la muestra poblacional de hombres en Guayaquil .
Autor: Daniel Xavier Regato Cajas

ASPECTOS EVALUADOS	PUNTAJE MÁXIMO	CALF.	COMENTARIOS
ESTRUCTURA Y REDACCIÓN DE LA MEMORIA	3	2.8	
Formato de presentación acorde a lo solicitado	0.6	0.6	
Tabla de contenidos, índice de tablas y figuras	0.6	0.5	
Redacción y ortografía	0.6	0.5	
Correspondencia con la normativa del trabajo de titulación	0.6	0.6	
Adecuada presentación de tablas y figuras	0.6	0.6	
RIGOR CIENTÍFICO	6	6	
El título identifica de forma correcta los objetivos de la investigación	0.5	0.5	
La introducción expresa los antecedentes del tema, su importancia dentro del contexto general, del conocimiento y de la sociedad, así como del campo al que pertenece	0.6	0.6	
El objetivo general está expresado en términos del trabajo a investigar	0.7	0.7	
Los objetivos específicos contribuyen al cumplimiento del objetivo general	0.7	0.7	
Los antecedentes teóricos y conceptuales complementan y aportan significativamente al desarrollo de la investigación	0.7	0.7	
Los métodos y herramientas se corresponden con los objetivos de la investigación	0.7	0.7	
El análisis de la información se relaciona con datos obtenidos	0.4	0.4	
Factibilidad de la propuesta	0.4	0.4	
Las conclusiones expresa el cumplimiento de los objetivos específicos	0.4	0.4	
Las recomendaciones son pertinentes, factibles y válidas	0.4	0.4	
Actualización y correspondencia con el tema, de las citas y referencia bibliográfica	0.5	0.5	
PERTINENCIA E IMPACTO SOCIAL	1	0.9	
Pertinencia de la investigación/ Innovación de la propuesta	0.4	0.3	
La investigación propone una solución a un problema relacionado con el perfil de egreso profesional	0.3	0.3	
Contribuye con las líneas / sublíneas de investigación de la Carrera/Escuela	0.3	0.3	
CALIFICACIÓN TOTAL*	10	9.7	

* El resultado será promediado con la calificación del Tutor y con la calificación de obtenida en la Sustentación oral.


Blgo. Xavier Alvatez Montero, Ph.D.
No. C.I. 0908695364

fecha: viernes 31 de agosto del 2018



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD CIENCIAS NATURALES
CARRERA BIOLOGÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN



ANEXO 10



REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACION

TÍTULO Y SUBTÍTULO:	ANÁLISIS POR EL MÉTODO SCD DEL NIVEL DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO DE LA MUESTRA POBLACIONAL DE HOMBRES EN GUAYAQUIL.		
AUTOR(ES) (apellidos/nombres):	REGATO CAJAS DANIEL XAVIER		
REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Blgo. ALVAREZ MONTERO XAVIER GUILLERMO, Ph.D. Blgo. ESCOBAR TROYA TELMO ARIEL, Msc		
INSTITUCIÓN:	UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL		
UNIDAD/FACULTAD:	CIENCIAS NATURALES		
MAESTRIA/ESPECIALIDAD:			
GRADO OBTENIDO:	BIÓLOGO		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	Septiembre 2018	No. DE PÁGINAS:	51
ÁREAS TEMÁTICAS:	Desarrollo Biotecnológico conservación y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y adaptación al cambio climático		
PALABRAS CLAVES/KEYWORDS:	Contaminación ambiental, Degradación, Espermatozoide, Infertilidad.		
RESUMEN/ABSTRACT Una de las causas de infertilidad masculina es la fragmentación del ADN espermático. En este trabajo se evaluaron pacientes por espermatograma y Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD). Para esto, se sondearon con pruebas de rutina a 75 individuos, de los cuales 43 (57%) fueron considerados para el estudio. Se clasificaron en cuatro grupos (G) de estudio, considerando las actividades laborales, siendo las áreas cerradas para G-1, al aire libre G-2, fumadores G-3 y, control G-4. En la correlación total de los Factores de Incidencia Intergénica (FII), la más alta fue entre el criterio de la edad con medicamentos ($p=0.9$) en G-3. En cuanto al análisis de afinidad de todas las morfoestructuras espermáticas (MEE), el 76% dio una correlación de $p=+1,-1$. De acuerdo a la asignación estimada por los componentes principales; G-1 demuestra una asociación positiva entre defecto de cabeza y cuello. Por otro lado, el Índice de Fragmentación (IDF) con mayor incidencia negativa se encontró en G-3 con el 29%. Finalmente la MEE y, la fragmentación del ADN presenta diferencia no significativa, además se logró observar que la infertilidad provocada por la fragmentación del ADN fue del 20%.			
ADJUNTO PDF:	☒ SI	☐ NO	
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: 2510963-0998083220		E-mail: gato_1490@hotmail.com
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	Nombre: FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES		
	Teléfono: 043080777		
	E-mail: info@fccnmgac.com		



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD CIENCIAS NATURALES
CARRERA **BIOLOGÍA**
UNIDAD DE TITULACIÓN



ANEXO 11

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR REVISOR

Habiendo sido nombrado **TELMO ARIEL ESCOBAR TROYA**, tutor del trabajo de titulación *Análisis por el método SCD del nivel de fragmentación de ADN espermático de la muestra poblacional de hombres en Guayaquil* certifico que el presente trabajo de titulación, elaborado por **REGATO CAJAS DANIEL XAVIER**, con C.I. No. 0917180465, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de **BIOLOGO**, en la Carrera de Biología/Facultad de Ciencias Naturales, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apto para su sustentación.

Guayaquil, 31 agosto del 2018

Blgo. XAVIER ÁLVAREZ MONTERO, Ph.D.

C.I. 0908695364



Universidad de Guayaquil

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN

ANEXO 12

**LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL
USO NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO ACADÉMICOS**

Yo, Daniel Xavier Regato Cajas con C.I. No. 0917180465, certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es **ANÁLISIS POR EL MÉTODO SCD DEL NIVEL DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO DE LA MUESTRA POBLACIONAL DE HOMBRES EN GUAYAQUIL**, son de mi absoluta propiedad y responsabilidad Y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizo el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines no académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente

Daniel Xavier Regato Cajas
NOMBRES Y APELLIDOS DEL ESTUDIANTE
C.I. No. 0917180465

*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.

RUBRICA DE EVALUACION MEMORIA ESCRITA TRABAJO DE TITULACION*

Título del Trabajo: ANALISIS POR EL METODO SCD DEL NIVEL DE FRAGMENTACION DE ADN ESPERMATICO DE LA MUESTRA POBLACIONAL DE HOMBRES EN GUAYAQUIL Autor (s): DANIEL XAVIER REGATO CAJAS			
Nombre del miembro del tribunal de Sustentación: M.SC. MONICA ARMAS SOTO.		Fecha de Sustentación: 11 de septiembre, 2018	
EVALUACION DE LA EXPOSICION ORAL	PUNTAJE MÁXIMO	CALF.	COMENTARIOS
El alumno realiza una presentación con seguridad, dirigiéndose hacia el tribunal, manteniendo su atención y manejando las transparencias o cualquier otro medio con soltura.	2		
Capacidad de análisis y síntesis, capacidad de organización, planificación y habilidad en la gestión de la información, administrando el tiempo de la exposición de manera adecuada.	2		
Las ideas se presentan de manera clara y comprensible, dominando el tema y utilizando recursos visuales y ejemplos. La presentación es original y creativa, sin uso excesivo de animaciones. Los elementos visuales son adecuados.	2		
Los contenidos que se exponen son adecuados, ajustados a la memoria escrita y en un lenguaje científico.	2		
Responde adecuadamente a las preguntas del tribunal, su actitud es respetuosa hacia los miembros del tribunal.	2		
CALIFICACION TOTAL **	10		
* Cada miembro del tribunal utilizara una rubrica para la evaluacion de la sustentacion y registrara su firma en el documento individualmente. ** El resultado será promediado con la calificación de la memoria escrita para la obtención de la Nota Final de Sustentación del Trabajo de Titulación.			
FIRMA DEL MIEMBRO DEL TRIBUNAL		FIRMA Y SELLO SECRETARIA DE LA CARRERA	
_____ C.I. No. 0907686240		_____	



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD CIENCIAS NATURALES
CARRERA **BIOLOGÍA**
UNIDAD DE TITULACIÓN



ANEXO 16-A

TRABAJO DE TITULACIÓN)

NOMBRE DEL ESTUDIANTE: DANIEL XAVIER REGATO CAJAS			
TITULO DEL TRABAJO DE TITULACION: Análisis por el método SCD del nivel de fragmentación de ADN espermático de la muestra poblacional de hombres en Guayaquil			
CALIFICACION DEL TRABAJO DE TITULACION			
EVALUACION DE LA MEMORIA ESCRITA	Calificación del Tutor del Trabajo de Titulación	NOTA PARCIAL 1:	
	Calificación del Tutor Revisor del Trabajo final de Titulación	NOTA PARCIAL 2:	
EVALUACION DE LA SUSTENTACION ORAL	Calificación de la sustentación del Trabajo de Titulación el Tribunal	NOTA PARCIAL 3:	
M.Sc. MONICA ARMAS SOTO	Promedio		
PhD. XAVIER ALVAREZ MONTERO			
M.Sc. WILLIAMS SANCHEZ ARIZAGA			
NOTA FINAL DEL TRABAJO DE TITULACION (promediar NOTA PARCIAL 1, 2 y 3)			
M.Sc. MONICA ARMAS SOTO Presidente de Tribunal	_____	C.I. No. 0907686240	
PhD. XAVIER ALVAREZ MONTERO Miembro del Tribunal	_____	C.I. No. 0908695364	
M.Sc. WILLIAMS SANCHEZ ARIZAGA Miembro del Tribunal	_____	C.I. No. 0925010696	
DANIEL REGATO CAJAS Estudiante	_____	C.I. No. 0917180465	
Ab. JORGE SOLORZANO Secretario	_____	C.I. No. 1201485594	
FECHA:	Guayaquil, 11 de septiembre, 2018		

Dedicatoria

Este trabajo de titulación está dedicado a la comprensión fraterna de mi esposa Viviana, al amor de Santiago (capullo de mi ser), a Xavier y Nancy padres del alma; a mis abuelitos Mary de Regato, Enrique y Nancy de Donoso, Wilson Cajas, Ana Flores, a mi hermano y amigo Nicolás, a mis tíos y primas y a mis suegros que me apoyaron hasta el final.

Adicionalmente a Carlos Julio conserje de la Facultad

En especial a mi abuelito Marcos Regato Román R.I.P.

Agradecimiento.

Doy gracias a mi DIOS eterno magnánimo y ser todo poderoso, por brindarme la vida, salud, familia y llenar de voluntad y, fortaleza en toda mi vida universitaria. Te agradezco Dios.

Al Dr. Francisco Xavier Blum Rojas. Director de Laboratorio y al Blga. Daysi Tatiana Puga Torres. Embriología, por compartir sus conocimientos y enseñarme a ponerlos en práctica todos procedimientos metodológicos del laboratorio; y permitirme realizar el trabajo en su prestigiosa institución el Centro Nacional de Reproducción Asistida INNAIFEST.

A todos los que me apoyaron y ayudaron para llegar a la meta con este trabajo de titulación sin querer excluir a nadie están mis esposa e hijo, mis padres, mis abuelitos, mis tíos en especial a Jaquelin Marisol Cajas por su ayuda, a mi suegros con su ayuda, mi tutor Ariel Escobar por su dedicación y paciencia.

Contenido

Dedicatoria	iv
Agradecimiento.....	xvii
Contenido	xviii
Índice de Figuras	xx
Índice de tablas:.....	xx
Índice de anexos	xx
RESUMEN.....	xxi
PALABRAS CLAVES	xxi
ABSTRACT	xxii
KEY WORDS	xxii
1. Introducción	1
Capítulo I.....	3
1.1. Justificación.....	3
1.2. Planteamiento del problema	4
2. HIPÓTESIS	5
3. OBJETIVOS	5
3.1. Objetivo general:.....	5
3.2. Objetivos específicos:	5
Capítulo II	6
4. Antecedente	6
4.1. Factores ambientales	7
4.2. Tabaquismo	8
4.3. Espermatoograma.....	8
4.4. Molécula de Ácido desoxirribonucleico (ADN)	9
4.5. Técnica Molecular de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD)	9
5. Marco Teórico	11
5.1. Etapas de la espermatogénesis	11
5.2. Mutaciones en el ADN	11
5.3. Fragmentación del ADN espermático	12
5.4. Apoptosis en el proceso de espermatogénesis.....	13
5.5. Remodelación de la cromatina espermática en las cadenas de ADN	14
5.6. Efecto de los Radicales Libres de Oxígeno (ROS) en el ADN	14

5.7.	Radiación y quimioterapia.....	15
5.8.	Técnicas para determinar la fragmentación del ADN Espermático	16
Capítulo III		21
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1.	Área de estudio:.....	21
6.2.	Diseño experimental:.....	21
6.3.	Selección de la población	21
6.4.	Matriz de encuesta.....	22
6.5.	Criterios de selección para la inclusión y exclusión de las muestras	22
6.6.	Protocolos para la examinación del líquido seminal	23
6.7.	Métodos: SCD Test	26
6.8.	Pruebas estadísticas:.....	27
Capítulo IV		28
7.	Resultados	28
7.1.	Categorización de la muestra	28
7.2.	Análisis por Componentes Principales de los factores externos con la calidad de los espermatozoides.	33
7.3.	Determinación del IDF por SCD.....	34
7.4.	Correlación grupal de las Morfo Estructuras Espermáticas y la Dispersión de la Cromatina Espermática	35
8.	Discusión.....	36
9.	Conclusiones	37
10.	Recomendaciones.....	38
11.	Referencias bibliográficas	38
12.	Anexos.....	43

Índice de Figuras

Figura 1.....	13
Figura 2.....	17
Figura 3.....	18
Figura 4.....	20
Figura 5.....	25
Figura 6.....	28
Figura 7.....	29
Figura 8.....	33
Figura 9.....	35

Índice de tablas:

Tabla 1.....	30
Tabla 2.....	32
Tabla 3.....	34
Tabla 4.....	34

Índice de anexos

Anexo 1.....	43
Anexo 2.....	44
Anexo 3.....	44
Anexo 4.....	45
Anexo 5.....	45
Anexo 6.....	46
Anexo 7.....	46
Anexo 8.....	47
Anexo 9.....	47
Anexo 10.....	48
Anexo 11.....	48
Anexo 12.....	49
Anexo 13.....	49
Anexo 14.....	50
Anexo 15.....	50
Anexo 16.....	51
Anexo 17.....	51

RESUMEN

Una de las causas de infertilidad masculina es la fragmentación del ADN espermático. En este trabajo se evaluaron pacientes por espermatograma y Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD). Para esto, se sondearon con pruebas de rutina a 75 individuos, de los cuales 43 (57%) fueron considerados para el estudio. Se clasificaron en cuatro grupos (G) de estudio, considerando las actividades laborales, siendo las áreas cerradas para G1, al aire libre G2, fumadores G3 y, control G4. En la correlación total de los Factores de Incidencia Intergénica (FII), la más alta fue entre el criterio de la edad con medicamentos ($p=0.9$) en G3. En cuanto al análisis de afinidad de todas las morfoestructuras espermáticas (MEE); el 76% dio una correlación de $p=+1,-1$. De acuerdo a la asignación estimada por los componentes principales; G-1 demuestra una asociación positiva entre defecto de cabeza y cuello. Por otro lado, el Índice de Fragmentación (IDF) con mayor incidencia negativa se encontró en G-3 con el 29%. Finalmente la MEE y, la fragmentación del ADN presenta diferencia no significativa, además se logró observar que la infertilidad provocada por la fragmentación del ADN fue del 20%.

PALABRAS CLAVES

Contaminación ambiental, Degradación, Espermatozoide, Infertilidad.

ABSTRACT

One of the causes of male infertility is spermatogenic DNA fragmentation. In this work, patients were evaluated by spermatograms and Sperm Chromatin Dispersion (SCD). This is compared with routine testing to 75 individuals, of which 43(57%) were considered for the study. They were classified into four study groups (G), considering work activities, being closed areas G1, open air G2, smoking G3 and control G4. In total correlation of the factors of intergenic incidence (FII), the highest was from the criterion of age with medicines ($p=0.9$) in G3. Analysis of affinity of all sperm morphostructures (MEE); 76% gave a correlation of $p=+1, -1$. According to the allocation estimated by main components; G1 shows a positive association between defects in the head and neck. On the other hand, the fragmentation index (IDF) with increased negative incidence was found in G3 with 29%. Finally, the MEE and the fragmentation of the DNA present no significant difference, also managed to observe that the infertility caused by the fragmentation of the DNA was 20%

KEY WORDS

Degradation, Environmental pollution, Infertility, Spermatozoon,

1. Introducción

La infertilidad, es un grado de patología que puede ser de carácter fisiológico, congénito o genético que sufre un 15% de las parejas en el mundo. Entre los factores de riesgo que inciden; está el uso inadecuado de métodos y medicamentos anticonceptivos. Según reportes de un total de consultas dirigidos a esta población basado sobre el factor de infertilidad, se estima que puede llegar al 50% entre hombres y mujeres (1:1) (Jalón Monzón et al., 2006). De acuerdo a datos reportados por La Clínica de Fertilidad Innaifest, (2016), indica que la tasa de infertilidad en Ecuador se enmarca entre el 12% y 15% de parejas en edad reproductiva y, sin excepción de clases sociales (Innaifest, 2016).

Entre las causas de infertilidad en el género masculino se encuentran los problemas obstructivos de la vía seminal, el fallo testicular primario, el varicocele, las infecciones urogenitales o los disturbios endocrinos entre otros. También existe un porcentaje de varones en los que no se encuentra una causa específica de infertilidad. (Jalón Monzón et al., 2006)

¿En que afecta los distintos ambientes laborables sobre la fragmentación del ADN espermático en hombres infértiles de este estudio?

Varios reportes demuestran datos comparativos de la técnica de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) versus las técnicas de SCSA, TUNEL, COMETA y, DBD FISH; mostrando resultados no significativos entre ellas, por lo que además de ser una técnica altamente fiable, eficiente y práctica varios autores sugieren su utilización para la evaluación de la fragmentación de ADN espermático. (Chohan, Griffin, Lafromboise, De Jonge, & Carrell, 2006)

Para poder determinar la fragmentación del ADN existen varias herramientas y, entre las que se enmarcan en lo molecular esta la técnica de la SCD Salvador Zaira, (2018), la cual se basa en la observación dada por la fluorescencia provocada en la desnaturalización del ADN, la misma que indica la formación de un bucle (halo) en una región de la molécula cuando su estado esta degradada (ruptura de regiones

espaciadoras del ADN cromosómico). Este método es relativamente nuevo y se reporta como una técnica simple, específica, altamente reproducible y, económica (Fernandez et al., 2003).

En este trabajo se evaluarán tres grupos de pacientes y uno de prueba (control), para determinar la viabilidad celular y los niveles de Fragmentación del ADN espermático en la población masculina de la ciudad de Guayaquil. Con la finalidad de establecer la incidencia de la infertilidad; se realiza la relación de los factores morfométricos celulares frente a la Fragmentación del ADN Espermático por (SCD).

Capítulo I

1.1. Justificación

En el proceso de la fecundación el ADN genómico del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la ascendencia, en la actualidad los parámetros obtenidos a través de un espermatograma no dan una información completa sobre el potencial fecundante del semen y la capacidad de dar lugar a un embrión sano y un embarazo evolutivo. Es por esto que ha aumentado el interés en desarrollar técnicas encaminadas a evaluar la fragmentación del ADN espermático, ya que en cualquiera de las etapas del proceso de la espermatogénesis se puede producir algún tipo de daño, siendo éste un fenómeno multifactorial y no del todo delimitado. Actualmente la infertilidad es un problema global que va en aumento y se ha demostrado que la calidad del ADN del espermatozoide puede afectar la fecundación; es por ello que la evaluación de la integridad del ADN, además del estudio de los parámetros seminales, puede aportar información adicional acerca de la calidad del de la infertilidad masculina y así orientar de mejor manera a las parejas.(Quintero–Vásquez, Bermúdez-Cruz, & Castillo-Cadena, 2015)

Las poblaciones que viven en ciudades y zonas urbanas densamente pobladas están permanentemente expuestas a la contaminación atmosférica producto de su actividad laboral o por condiciones atmosféricas debido al auge de industrias y avances tecnológicos, que afectan nuestra salud en muchas maneras. (Bosco et al., 2018)

Los distintos tipos de ambientes de trabajo pueden ayudar a minimizar estos riesgos o agravarlos, uno de los daños que producen este tipo de contaminación es el de la fragmentación del ADN espermático, esta condición es multifactorial y se puede dar por patológicas locales o sistémicas, enfermedades bacterianas y condiciones ambientales.(Fraczek, Szumala-Kakol, Dworacki, Sanocka, & Kurpysz, 2013)

La fragmentación del ADN espermático se reconoce cada vez más como una causa importante de infertilidad. En este estudio se usará como método la prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD), la cual es relativamente nueva para la detección de la fragmentación del ADN espermático en el semen. La prueba de SCD se basa en el principio de que los espermatozoides con ADN fragmentado no producen el halo característico de los bucles de ADN dispersos que se observa en la cabeza de los espermatozoides con ADN integro o sano. La prueba SCD es un método simple, preciso, altamente reproducible y de bajo costo para el análisis de la fragmentación del ADN espermático en esperma y esperma procesado. Por lo tanto, la prueba SCD se podría utilizar potencialmente como una prueba de rutina para el análisis de la fragmentación del ADN espermático en cualquier laboratorio de andrología. (Fernandez et al., 2003)

En Ecuador no se registran trabajos relacionados con la fragmentación del ADN espermático y su relación con la salud reproductiva, reproducción asistida y la contaminación ambiental.

1.2. Planteamiento del problema

La calidad y la cantidad de los espermatozoides son vitales para la reproducción de cualquier especie, ya que a mayor número de lesiones en el ADN de los espermatozoides, menor será la probabilidad de un embarazo a término (Salvador Zaira, 2018), la contaminación ambiental en las zonas urbanas producida por condiciones atmosféricas, radiación, vibración, ionización del aire, contaminación lumínica, temperatura a las cuales estamos expuestos todos los días de manera continua o por largos periodos en las últimas décadas, han provocado una declinación de la producción y calidad de espermatozoides generando un problema de salud reproductiva. (Bosco et al., 2018)

El análisis del espermatograma es utilizado como una prueba básica de evaluar la calidad seminal, recientemente el análisis de fragmentación espermática ha tomado importancia

dado los diversos estudios que han demostrado que la integridad de ADN en el espermatozoide puede afectar la fecundación o la evolución del embrión. (Portella, López, Noriega-Hoces, & Guzmán, 2013)

En los tratamiento de reproducción asistida, la integridad del ADN en el espermatozoide es esencial para el correcto desarrollo del embrión, una elevada cantidad de fragmentación del ADN están estrechamente relacionados en la infertilidad del hombre, como en abortos espontáneos en la mujer, si se llega a fecundar no hay registro que demuestren que afecta la primera y segunda etapa de escisión del embrión, pero si cuando está en blastocito o cuando el gen paterno se activa. (CeFeGen, 2018)

2. HIPÓTESIS

La Fragmentación del ADN puede ser causada por los distintos tipos de ambiente en los que laboran los hombres infértiles.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Determinar el nivel de fragmentación del ADN espermático por la técnica SCD en una población de hombres infértiles en Guayaquil.

3.2. Objetivos específicos:

- Categorizar la población de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión epidemiológica y sus áreas de incidencia.
- Analizar la incidencia de la contaminación atmosférica asociada a la calidad de espermatozoides en una población mestiza ecuatoriana.
- Correlacionar las tipologías fenotípicas frente a las moleculares de los espermatozoides.

Capítulo II

4. Antecedente

En América Latina más de 100 millones de personas viven en áreas susceptibles a la contaminación atmosférica (Pb, Cd, As, CO₂ etc) según la OMS; 17 de 33 países de esta región se han visto la tarea de medir la calidad del aire de alguna manera, de acuerdo a estos reportes las estaciones suelen estar ubicadas en las ciudades con mayor índice de personas en cada país,(OPS OMS, 2016). Los ambientes tóxicos y, una vida sedentaria y ciertos hábitos como el consumo de cigarrillo, droga, alcohol; provocan un decaimiento en la salud general de las personas, entre ellos está la infertilidad que según nuevos reportes va en aumento en este nuevo siglo(Antonio Requena, 2013).

Como parte del examen de rutina que se emplea para detectar las causas de la infertilidad está el espermatoograma, el cual se basa en la examinación de los parámetros seminales para identificar la causa de la patología (Ivan Ochoa, 2012), cuando los valores dan normales (20 a 30%); se recurre a otro tipo de prueba la cual se examina el ADN espermático; puesto que para una correcta fecundación la molécula debe llegar sin ninguna anomalía ni ruptura (Cortés-Gutiérrez, Dávila, López-Fernández, Fernández, & Gosálvez, 2007),cuando esto sucede se determina el grado de daño; para relacionar la degradación frente algún factor sea interno o ambiental que podría ser el causal de la infertilidad, entre los factores internos que pueden dañar el ADN está la apoptosis, remodelación de la cromatina espermática y, los radicales libres de oxígeno (Sakkas & Álvarez, 2011).

4.1. Factores ambientales

Los niveles de partículas en suspensión permitidos OMS, (2018) para el ser humano debe estar máx. $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$. En Ecuador, las ciudades que registran límites superiores son Santo Domingo con $33 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y, Milagro (Prov. Guayas) con $32 \mu\text{g}/\text{m}^3$. (Ministerio del Ambiente, 2014)

Según reportes del proyecto Huellas de Ciudades; en la ciudad de Guayaquil se genera 6,8 tonelada de metales pesados, partículas en suspensión y dióxido de carbono (CO_2) al año, de las cuales 39% provienen del transporte (principalmente por el consumo de gasolina y Gas Licuado de Petróleo GLP), 25% de residuos (disposición de desechos), 16% de zonas residenciales (Consumo de energía eléctrica y GLP), 14% del sector industrial (por uso eléctrico y diésel) y 6% del comercio e institucional.(Fundación Futuro Latinoamericano (FFLA), 2015)

La contaminación es una de las causas por las que según estudios de Rubes, Selevan, Sram, Evenson, & Perreault,(2007) los hombres que tienen una delección homocigótica del gen glutathione S-transferasa mu 1 (GSTM1) son más propensos a sufrir un daño del ADN espermático por factores ambientales, los estudios revelaron que los metabolitos cancerígenos de hidrocarburos policíclicos aromáticos (cPAHs), se pueden acumular en los testículos y, el epidídimo los cuales pueden interferir en la espermatogénesis, estos metabolitos pueden reaccionar con el ADN y pueden provocar mutaciones en el núcleo de los espermatozoides.

Bosco et al. (2018) Concluyó que los efectos de los contaminantes ambientales tienen un impacto sobre la cromatina de los espermatozoides, y que los valores por encima del 30% en el Índice de Fragmentación del ADN (IDF) indican problemas claros de infertilidad. Por otro lado, los factores térmicos están relacionados con el estrés oxidativo, los cuales producen daño directo o indirectamente al espermatozoide, por medio de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y actividad de los antioxidantes; provocando fragmentación del ADN, (Rose et al., 2018)

4.2. Tabaquismo

El consumo de cigarrillo está asociado a muchos problemas de salud, aproximadamente el 15% de las personas en el mundo son identificadas como infértiles debido a su consumo, de los cuales los hombres constituyen el 50-60% (Harlev, Agarwal, Gunes, Shetty, & du Plessis, 2015), cuando una persona consume cigarrillo provoca la liberación del Cadmio en nuestro organismo que ingresa por los pulmones y alcanza el semen por medio de la sangre que llega a los testículos, este metal tóxico desequilibra el nivel Reactivo de la Especies de Oxígeno ROS en el plasma seminal, afectando la morfología del ADN espermático. (Ranganathan, Rao, Sudan, & Balasundaram, 2018) Según Lingappa et al. (2015) concluyeron que la mayoría de los hombres infértiles sin una causa aparente demostrada mediante exámenes físico-químicos y morfométricos del semen eran fumadores, y que los parámetros seminales vitales fueron notablemente bajos debido al tabaquismo, además de que se producía un declive adicional por el consumo continuo y superior a los 5 años.

4.3. Espermatograma

Es una herramienta básica que proporciona información para evaluar el nivel de fertilidad en el varón; este examen clínico mide los parámetros básicos físico-químicos del semen y el morfológico del espermatozoide, en los estudios también se observan otras variables como la edad, días de abstinencia, padecimiento congénito, enfermedades padecidas y actividad laboral. (Ivan Ochoa, 2012)

Jose Ortiz (2014) Se estima que de todos los pacientes que son sometidos a un espermatograma básico, sólo el 25% de los casos no se puede detectar la causa del problema, por este motivo se envía hacer una prueba molecular para detectar problemas en el ADN espermático; de ahí qué, el otro porcentaje entre el 20% o 30% de ellos los resultados salen normales, y el resto se detecta el problema; dependiendo de este resultado el paciente es sometido un tratamiento (Instituto BERNABEU, 2018)

Según Cutié, Nápoles, and Fabars, (2016) sobre una población de pacientes infértiles se estableció que el factor que predominó fue la enfermedad del Varicocele, se determinó que ninguno de los pacientes vivía o trabaja en ambientes tóxicos, cuando se obtuvieron los valores de la morfología de estos pacientes; los espermatozoides normales y deformes, sin embargo se comprobó que todos los pacientes tenían hábitos tóxicos como fumar y consumir alcohol, al contrastarlos con los pacientes que no tenían estos hábitos; sus valores de morfología espermática eran normales para estos últimos.

4.4. Molécula de Acidodesoxirribonucleico (ADN)

En la fecundación se da la bipartición del material genético a su progenie, por esta razón es esencial que llegue de manera viable, son tres etapas las que debe cruzar el ADN antes de tomar su estructura definitiva, la primera etapa es la Mitosis que es una división celular, la segunda etapa es la Meiosis la cual produce células haploides propias de las células sexuales y la tercera etapa es la espermiogénesis donde el ADN cambia de histonas por protaminas para poderse enrollarse y reducir hasta 6 veces su tamaño para poder estar dentro de la cabeza del espermatozoide la cual es la célula más pequeña del hombre (E & Jj, 2017).

4.5. Técnica Molecular de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD)

Esta prueba, así como otras se utilizan para determinar la fragmentación del ADN espermático, cuando en el examen de espermatograma no se encuentra una causa aparente de la condición de infertilidad, muchos estudios determinan a esta prueba como simple, de bajo costo, que no requiere de una persona especializada, precisa y altamente reproducible. (Fernandez et al., 2003)

Según un reporte, cuatro técnicas SCSA (Ensayo de la Estructura de la Cromatina Espermática), TUNEL (Terminal dUTP nick-end Labeling Assay), SCD (Dispersión de la Cromatina Espermática) y AOT (Ensayo de Naranja de Acridina) se utilizaron para

comparar entre si el nivel de fragmentación del ADN, entre los resultados, las técnicas SCSA, TUNEL y SCD registraron valores diferenciales no significativos entre ellas, habiendo diferencia con la técnica AOT. El Índice de Fragmentación (IDF); para la técnica molecular AOT mostros rangos mayores que las técnicas SCSA, TUNEL y SCD, siendo esto significativo en las tres frente a AOT.(Chohan et al., 2006)

Dorado Silva et al. (2008) Al intentar correlacionar los parámetros seminales con el nivel de fragmentación del ADN aplicando el método del SCD de 212 pacientes, solo considero como una patología a la fragmentación; cuando los niveles superaban el 30%. Por otro lado, no encontró diferencia significativa entre el daño del ADN y la morfología, mientras tanto que la correlación negativa entre el porcentaje de movilidad y, la fragmentación fue significativa para el indicador.

Portella, López, Noriega-Hoces, & Guzmán (2013) En su modelo predictivo analizó 316 pacientes con un rango de edad de 22 a 68 años y, con un promedio de 40 (DV: ± 7) años de edad, se determinó que los rangos asignados pueden incidir en los valores de la viabilidad y motilidad; también demostró una correlación negativa con la fragmentación de ADN espermático, en este último utilizando la técnica de SCD.

Bosco et al., (2018) Realizaron un trabajo para determinar la relación entre la calidad de ADN espermático frente a los factores ambientales, los resultados demostrados estimaron una asociación con la calidad del semen, puestos que los pacientes que vivían en áreas con los niveles de contaminación por debajo de los establecidos o que no trabajaran en ambientes tóxicos, daban un porcentaje de fragmentación por debajo del 30%. Los autores concluyen que los factores ambientales afectan en la fragmentación del ADN y, sugieren que se podría considerar esta prueba como un bioindicador sensible y temprano sobre los efectos de la contaminación ambiental en la calidad del semen.

5. Marco Teórico

5.1. Etapas de la espermatogénesis

La formación de los gametos masculinos sigue el proceso de meiosis para formar 2 células de igual tamaño y composición (divisiones simétricas). Además, en el tercer mes de embarazo de los fetos masculinos, al contrario de lo que ocurre en los femeninos, las pre-espermatogónias no se multiplican, sino que entran en un periodo de latencia en el que van a permanecer prácticamente hasta la pubertad del niño. En la pubertad, inician un intenso proceso de multiplicación celular mediante mitosis sucesivas y continuas, que forman las espermatogónias y estas los espermatocitos primarios, en los que se inicia el proceso de la meiosis. En esta, se producirán 4 espermátidas con la mitad del número de cromosomas, las cuales seguirán un proceso de transformación celular para adquirir la estructura de espermatozoides maduros.(Reus Rebeca, 2017)

Esta última transformación es un proceso complejo, que no solo incluye la pérdida del citoplasma y la adquisición del flagelo, sino una importante modificación de la estructura de la cromatina del núcleo. Básicamente se trata de cambiar la configuración de la estructura de la cromatina para que el ADN se compacte mucho más, de forma que se pueda incluir en el pequeño espacio del núcleo del espermatozoide (que es la célula más pequeña de los seres humanos).(Martínez-Frías, 2010)

5.2. Mutaciones en el ADN

Las mutaciones son cambios en los genomas de los biomas y, elementos no biológicos, estas pueden ser congénitas o inducidas, de acuerdo a su origen su efecto podría afectar a la funcionabilidad de las células somáticas o germinales. Los tipos de mutaciones pueden ser puntuales; las mismas que se enmarcan sobre los cambios en la organización de los genes o grupos de genes específicos y, no producen una alteración al fenotipo. Por otro lado, están los del tipo cromosómico, siendo en los autosomas o sexuales cuya consecuencia puede ocurrir en la forma estructural de la molécula de los ácidos nucleicos;

Delección: es un tipo de mutación genética en la cual se pierde material genético, desde un solo par de nucleótidos de ADN hasta todo un fragmento de cromosoma. (NHGRI, 2016)

Duplicación: es un tipo de mutación donde se produce una o más copias de un gen o región de un cromosoma.(NHGRI, 2016)

Translocación e Inversión: es un cambio localizado de una región del cromosoma a otro cromosoma. (Adam, 2018)

Numéricos; Aneuploidia y Poliploidia son mutaciones que se producen en la meiosis, cuando no se separan los cromosomas correctamente por lo que una de las células recibe el par de la otra.(Manuel & Herrera, 2010)

5.3. Fragmentación del ADN espermático

Este proceso puede ocurrir en varias regiones del ADN, el punto cardinal de este evento es la translocación o delección de fragmentos de nucleótidos, lo que conduce a la segmentación de una o varias regiones de la molécula, los mismos que pueden ser provocados durante la producción o el transporte a las células espermáticas. En el marco de este proceso puede ligarse a la apoptosis celular y, la remodelación de la cromatina espermática en las cadenas de ADN, cuando los espermatozoides son transportados desde los túbulos seminíferos al epidídimo, este ciclo también puede ser alterado por la síntesis de los radicales libres de oxígeno (incluido el radical hidroxil y óxido nítrico) Fig.1

Varios reportes dirigen sus resultados al efecto que producen los factores físico-químicos del entorno del individuo. Entre los externos están la radiación ultra violeta, quimioterapia, compuestos ambientales, cigarrillo y humo del tabaco(Sakkas & Álvarez, 2011)

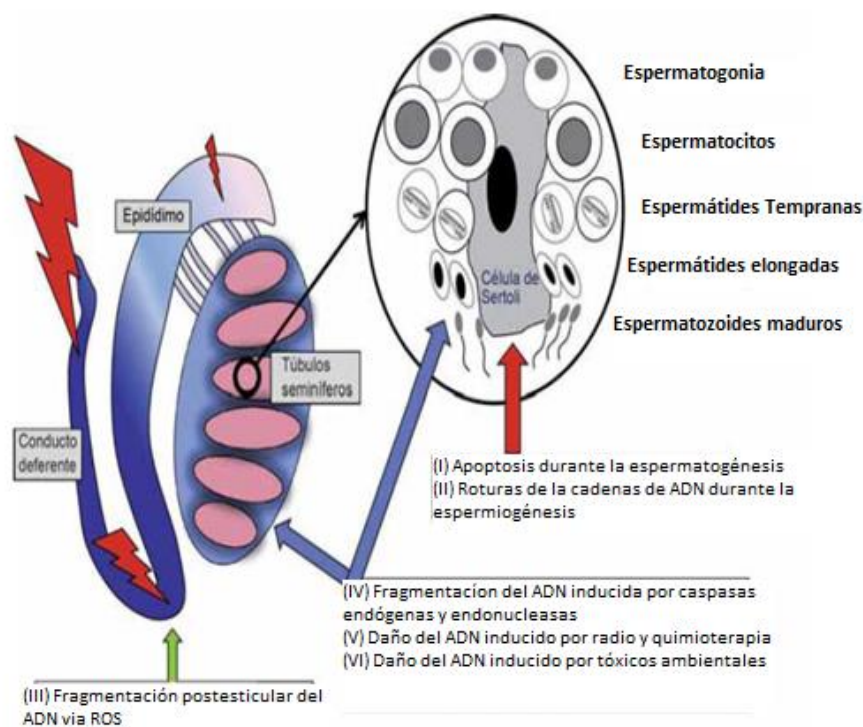


Figura 1 Principales factores de la fragmentación espermática a partir de la apoptosis en la célula de Sertoli hasta los factores externos como la contaminación atmosférica y la radiación (Sakkas & Álvarez, 2011)

5.4. Apoptosis en el proceso de espermatogénesis

La muerte celular programada, es un mecanismo de desactivación funcional de la célula, lo que conduce a la lisis y, deceso regulado; este proceso es activado por un conjunto de genes específicos microRNAs/miRNAs. (Su, Yang, Xu, Chen, & Yu, 2015) , estos genes sintetizan moléculas efectoras cuya función es la creación de una barrera natural, la cual inhabilita la supervivencia y amplificación de células infectadas o con deterioro a nivel del genoma y su diseminación. (Su et al., 2015)

Durante el proceso de espermatogénesis el mecanismo de selección de células germinales sanas está supervisada por las células de Sertoli, las cuales son responsables del etiquetado y la inducción de la Apoptosis, esto es en un 50 a 60% de todas las células germinales que entran en la fase de Meiosis I. Por otro lado, estas células reguladoras, cuando existe deterioro o contaminación de células por agentes virales o

microbianos intracelulares, asignan a dichas células con marcadores apoptóticos de tipo Fas; para poder ser fagocitadas y eliminadas. (Verbrugge, Johnstone, & Smyth, 2010)

Una vez ocurrido el proceso de etiquetado de la membrana celular e inducción de señal para el mecanismo humoral, varios reportes han demostrado que este mecanismo no es 100% efectivo, para obtener células sanas, y concluyen que un porcentaje de estas células germinales con características defectuosas entran en el proceso de remodelación en la espermiogénesis y, posteriormente en la eyaculación. (Sakkas & Álvarez, 2011)

5.5. Remodelación de la cromatina espermática en las cadenas de ADN

La cromatina es un compuesto que está formado por el ADN y las histonas, estos constituyen la base para poder formar los cromosomas, los mismos que se forman cuando el ADN que está formado por ácidos se acoplan a las histonas que tienen bases, esto permite darle estabilidad a la molécula para así poder enrollarse sobre sí mismas al punto de poderse empaquetar, todo esto ocurre durante la etapa de la Profase en la Meiosis. (Gupta, Pentakota, Mishra, Jones, & Rao, 2017).

En el proceso de la espermatogénesis este compuesto se ve reorganizado en su estructura y función, durante el empaquetamiento del ADN las enzimas endonucleasas se activan para ayudar en la creación y los cortes de los nudos de la cromatina, estas digestiones permiten una disminución de la tensión torsional del espiral de la molécula, y facilitar la sustitución de las histonas por protaminas, (Celeste, 2016). Por otro lado de no ocurrir este proceso, puede culminar con anomalías en el empaquetamiento o cortes en los nudos que no fueron reparados en el cromosoma. (E & Jj, 2017)

5.6. Efecto de los Radicales Libres de Oxígeno (ROS) en el ADN

Las células para poder realizar la síntesis de biomoléculas necesitan de energía, la cual adquieren por el desdoblamiento de los nutrientes en reacción con el oxígeno en las mitocondrias durante este proceso también se producen los radicales libres, sin embargo

estos ayudan a cumplir funciones en la células, y solo puede ser perjudicial cuando el número de radicales sobrepasan al de antioxidantes producido por la misma célula, este efecto se lo conoce como estrés oxidativo.(Marotte & Zeni, 2013)

Las espermátidas durante el proceso de especialización celular, para poder adquirir la estructura de espermatozoides maduros requieren de un gasto de energía y liberación de radicales libres, todo esto ocurre cuando circulan por los túbulos seminíferos hacia la cola del epidídimo, la estabilidad de los radicales se estima en nanosegundos o microsegundos; ese tiempo es suficiente para afectar a los espermatozoides maduros, considerando que estas células se encuentran altamente comprimidos.(Rose et al., 2018)

5.7. Radiación y quimioterapia

Los cuerpos producen algún tipo de energía, entre ellas la de mayor emisión es lumínica o calórica. Los efectos colaterales que provocan la exposición directa a ellos, ya sea de manera poco frecuente o prolongada; clínicamente la incidencia de esta exposición en los seres humanos han sido extensamente estudiados, actualmente con la tecnología los estudios apuntan a la radiación no ionizante y sus efectos en los organismos, las cuales según Hill, O'Neill, & McKenna, (2016) concluyeron que la resonancia magnética a pesar de que se deben hacer más estudios puede producir rupturas en la doble cadena de ADN y aberraciones cromosómicas.

Por otro lado estudios sobre la radiación electromagnética reveló que el uso continuo del celular y el lugar donde se lo guarde pueden interferir en el proceso de la espermatogénesis, puesto que provoca un incremento de la muerte celular programada. (Abad inés, Deba Shuyana, & Del Rio Javier, 2016)

En cuanto a la radiación iónica hay reportes de un impacto negativo ante una gran exposición, como por ejemplo la quimioterapia con lo que son tratados los pacientes con cáncer, el cual provoca en los espermatozoides daños significativos en el ADN al nivel de la cromatina, reduciendo el nivel de protaminación; alterando la compactación del ADN.(Flaherty, 2014)

5.8. Técnicas para determinar la fragmentación del ADN Espermático

Varias técnicas son empleadas para determinar la fragmentación del ADN, cronológicamente el ensayo de la estructura en la cromatina espermática (SCSA) fue el primer método usado a principios de los 90, con la cual se pudo desarrollar el (IDF) índice de fragmentación, por medio de la desnaturalización del ADN por ácido. La cual se inicia utilizando un ácido (1,2 pH) que nos permite abrir las cadenas de ADN con lo cual podremos teñirlo con acridina naranja lo que permitirá unirse a las cadenas de ADN y se marcarán de rojo fluorescente si la cadena tiene alguna ruptura en su estructura y verde fluorescente si está intacta fig.2 (Evenson, Jost, Baer, Turner, & Schrader, 1991)

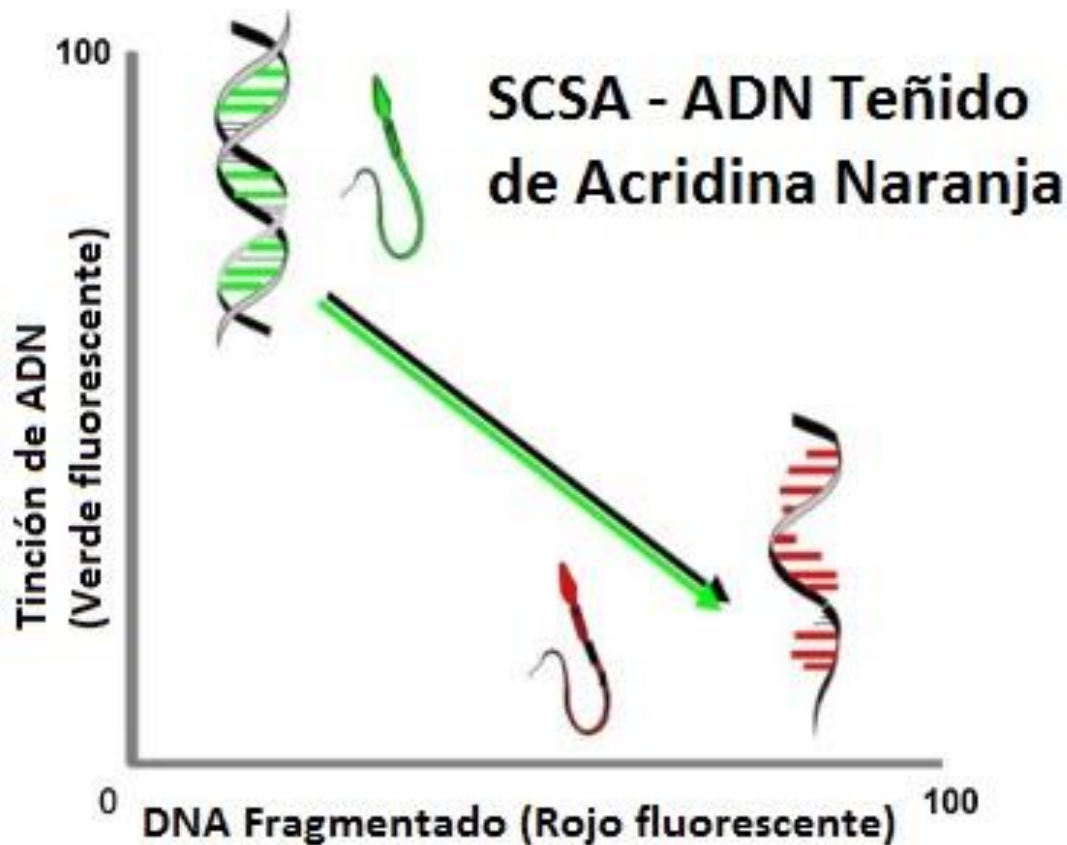


Figura 2 se visualiza las dos diferentes tonalidades que el espermatozoide tomará con la tinción de acridina naranja; verde fluorescente para las cadenas de ADN integras en su estructura, y el color rojo fluorescente para las cadenas de ADN fragmentadas (Center for Woman's Health, 2015)

La técnica de TUNEL, cuyas siglas vienen del inglés “Terminal dUTP nick-end Labeling Assay” fue reportada en 1992, (Gavrieli, Sherman, & Ben-Sasson, 1992). Esta herramienta es ampliamente usada en muestras de humanos y animales. Se basa en el uso del marcador trifosfato de desoxiuridina (dUTP), que se agrega a los extremos libres 3' OH del ADN monocatenario o bicatenario, por medio de una enzima llamada Terminal Deoxynucleótidos Transferasa (TdT).

Estos dUTP pueden marcarse directamente sobre la ruptura del ADN o también pueden darse por la amplificación para absorber el anticuerpo anti-dUPT, entre más rupturas tenga la cadena más de estos fragmentos se incorporarán y por ende estará más teñida la célula, esto puede observarse microscópicamente, o se puede evaluar por una citometría de flujo que detecta la fluorescencia intracelular de dUTP marcado con

fluorocromo y así evaluar la fragmentación del ADN. Fig.3 (Sharma, Masaki, & Agarwal, 2013)

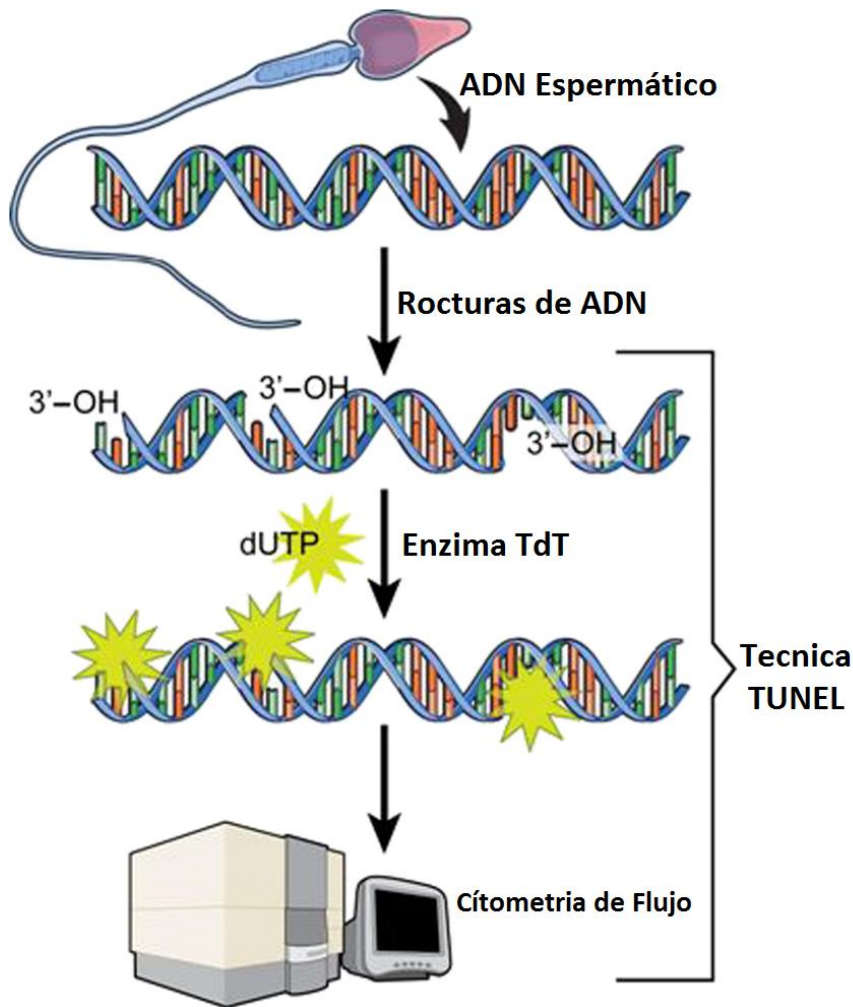


Figura 3 Técnica de TUNEL (Terminal dUTP nick-end Labeling Assay). Se basa en la integración de fragmentos dUTP los cuales se unen a las regiones del ADN Dañados y mediante un citometría de flujo se puede cuantificar la fragmentación del ADN espermático. (Malvezzi, Sharma, Agarwal, Abuzenadah, & Abu-Elmagd, 2014)

Ensayo del Cometa, (ensayo de electroforesis en gel de células individuales) es una técnica publicada en 1984, determina el daño del ADN en las células por medio de electroforesis, pero en el año 1996 se modificó para emplearse en espermatozoides, es un método relativamente simple, el cual revela las roturas de cadena en el ADN en los espermatozoides individuales (E & Jj, 2017)

Para el desarrollo y, la visualización de los resultados de esta técnica, se estima el efecto en las células espermáticas, para ello se observa la incrustación del ADN en una capa

delgada de agarosa, ubicada en una cámara de vidrio o portaobjetos y se someten a lisis con detergente en condiciones de alta salinidad. Este proceso elimina protaminas e histonas que permiten que el núcleo forme una estructura tipo nucleóide que contiene bucles superenrollados de ADN. Las condiciones de pH alcalinas dan como resultado la anulación del ADN bicatenario, y la posterior electroforesis da como resultado la migración de hebras rotas hacia el ánodo, formando una cola de cometa, cuando se observa bajo un microscopio de fluorescencia. La cantidad de ADN en la cabeza y la cola se refleja por su intensidad fluorescente. La fluorescencia relativa en la cola en comparación con su cabeza sirve como una medida del nivel de daño en el ADN. (Simon & Carrell, 2013).

Actualmente para determinar la fragmentación de ADN en células germinales de vertebrados e invertebrados, es la técnica de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) (Fernandez et al., 2003). El principio básico es la desnaturalización del ADN, donde la formación de halos de ADN determina la fragmentación de la molécula. Se ha comprobado que aquellos espermatozoides con ADN fragmentado no se desnaturalizan por ende no está en capacidad de liberar los bucles de ADNA alrededor de la cabeza del espermatozoide, lo cual se observan Bucles o halos casi imperceptibles o definitivamente ausencia del mismos.

La valoración se realiza mediante el conteo de los espermatozoides con halos bien dispersos de su molécula de ADN cromosómico, versus los que no hayan formado ningún tipo de halo para poder realizar esta valoración se debe tener un microscopio tanto de campo claro como de fluorescencia. También existen herramientas que permiten hacer esta valoración de manera computarizada, mediante el uso de programas tipo CASA (Analizador de Esperma asistido por computadora). La técnica, requiere el uso de microgeles pero sin electroforesis. Fig.4 (Cortés-Gutiérrez et al., 2007)

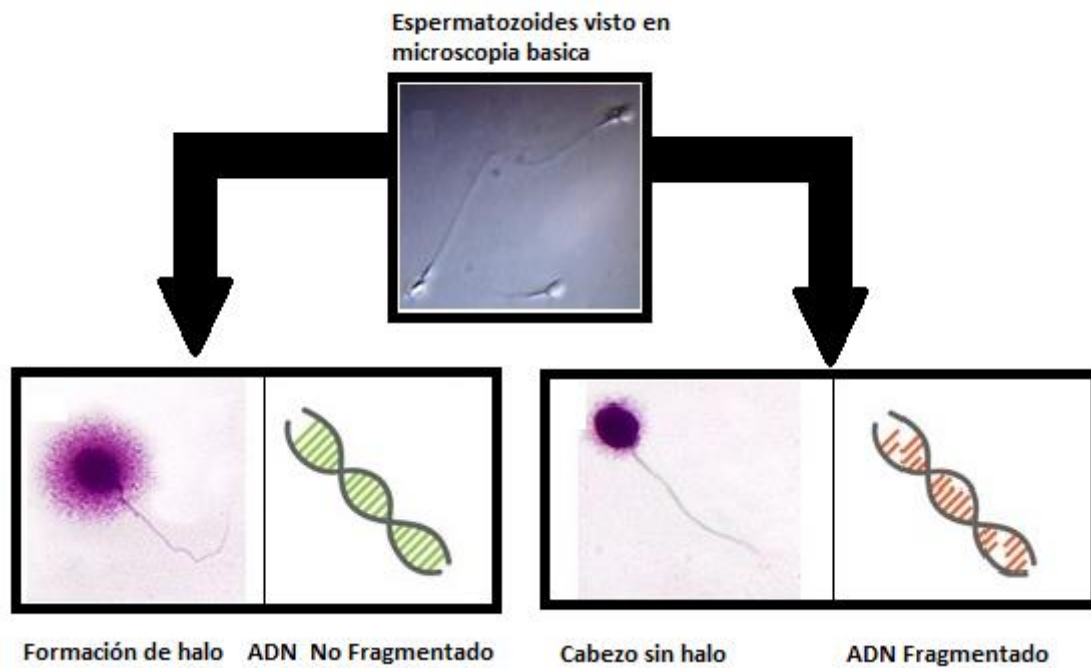


Figura 4 el ensayo de SCD A) formación de Bucles (halos) teñidos en la cabeza del espermatozoide que indica un ADN intacto B) los espermatozoides vistos desde un microscopio de campo claro C) la no formación de los Bucles propios del ADN Fragmentado. (Innaifest, 2017)

Capítulo III

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio:

Se efectuó en la provincia del Guayas, ciudad de Guayaquil; con una población mestiza de hombres que presento un cuadro clínico de infertilidad.

6.2. Diseño experimental:

Se lo realizo en el Centro Nacional de Reproducción Asistida en el Laboratorio de Andrología INNAIFEST. Para esto, se utilizó un método de selección primaria no aleatoria unidireccional, con anexo implícito de cuatro variables cuantitativas poblacionales, cinco morfoestructurales y una molecular.

6.3. Selección de la población

Se eligieron pacientes con problemas de infertilidad que se realizarían la prueba diagnóstica del SCD solicitada por su respectivo Doctor (los cuales dieron su aprobación para usar su información en este trabajo).

Del tándem de pacientes seleccionados, fueron divididos e identificados en cuatro grupos de trabajo para su estudio.

- **Grupo 1:** Pacientes que trabajan en áreas de oficinas y que no tiene un contacto directo con factores contaminantes del medio ambiente.
- **Grupo 2:** Pacientes que trabajan en áreas abiertas y que están expuesto directamente y en tiempos prolongados a factores contaminantes del medio ambiente.
- **Grupo 3:** Pacientes que fuman y fumadores pasivos.
- **Grupo 4:** Pacientes donadores (sanos).

6.4. Matriz de encuesta

Es un formulario protocolo diseñado por el Centro Nacional de Reproducción Asistida Laboratorio de Andrología INNAIFEST; para realizar el registro de los datos de los pacientes asignados para los exámenes. Este documento se enmarca en descriptores básicos, epidemiológicos y, clínico-farmacológicos.

- Descriptores básicos: Edad, días de abstinencia, actividad laboral, si en su área de trabajo usa químicos, fuma y el uso del celular
 - Descriptores epidemiológicos: enfermedades (congénitas y adquiridas): varicocele, papera y enfermedades oncológicas
 - Descriptores clínico-farmacológicos: registro de tratamientos profilácticos, intervención quirúrgica que causa infertilidad. Administración de medicina.
- (Anexo 1)

6.5. Criterios de selección para la inclusión y exclusión de las muestras

Estos serán seleccionados en función de la alteración que afecte al resultado como:

- **Inclusión:** Se toma en cuenta los factores: edad, días de abstinencia, actividad laboral, si usa químicos o tiene alguna enfermedad como Papera, Varicocele, e oncológica, si tiene hábitos como fumar o el uso del celular y si se médica.
- **Exclusión:** Se toma en cuenta los factores: prostatitis, fiebre y registro de golpes u operación en la región pélvica o zona de los órganos sexuales que causara la infertilidad.

6.6. Protocolos para la examinación del líquido seminal

a. Toma de muestra

Se lo realiza de acuerdo con las normas publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Para el examen, el laboratorio establece codificar y protocolizar la muestra del líquido seminal (Cooper et al., 2009) en base a la normativa de la OMS, para lo cual debe cumplirse lo siguiente.

- El paciente debe tener una abstinencia sexual mínima de dos y no más de cinco días.
- La muestra debe ser obtenida; vía única de masturbación, sin lubricación ni preservativos.
- Se debe recoger la muestra en un frasco estéril de capacidad de 100mL (titulado con el código de identificación de paciente) y, mantener a 37 °C hasta el momento de los exámenes correspondientes.
- Las pruebas básicas, como el espermatograma no debe pasar más de 90 horas desde la hora de la recolección.

b. Determinación de parámetros básicos (Volumen Final, Color, pH).

- Comprobar el Volumen Final por medio de una jeringuilla de 5 ml, la cual se realiza por toma directa del volumen total del semen que se encuentra en el colector.
- Observar el color de la muestra, para ver si tiene sangre o si requiere algún tipo de examinación clínica, los colores normales son: blanco, opalescente, gris, perlado.
- Medir el pH utilizando tiras de revelado, para lo cual se coloca 10 µl de semen (pH normal del semen es ligeramente alcalino).

c. Concentración de espermatozoides por volumen de la muestra

- Se coloca 10 µL de semen en la cámara de Makler (Anexo 2).
- Se observa al microscopio invertido en el lente de 10X y objetivo 40X, filtro monocromático de luz verde.

- Se cuenta el número de espermatozoides (móviles o inmóviles) en 10 cuadros continuos de la cámara y, en sentido horizontal o vertical (Anexo 3).
- El valor obtenido se multiplica por (206) factor *K* de la cámara, aquí se determina la Concentración [cél / mL].

Cálculos paramétricos del espermatoograma

d. Porcentaje de espermatozoides móviles e inmóviles.

- Se determina con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de espermatozoides móviles} = \frac{\# \text{ de espermatozoides móviles} \times 100}{\sum \text{ total de espermatozoides móviles e inmóviles}}$$

$$\% \text{ de espermatozoides Inmóviles} = \frac{\# \text{ de espermatozoides inmóviles} \times 100}{\sum \text{ total de espermatozoides móviles e inmóviles}}$$

e. Concentración total de espermatozoides.

- Se calcula con el valor de la Concentración [cél / mL] por el Volumen Final de la muestra

f. Total de espermatozoides Móviles.

- Se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Total de espermatozoides Motiles} = \frac{\text{Concentración Total De Espermatozoides}}{.} \times \frac{\text{Porcentaje de Espermatozoides motiles}}{100 .}$$

g. Porcentaje de Traslación Progresiva y no Progresiva

- Se considera traslación progresiva a los espermatozoides que se mueven por la placa, mientras la traslación no progresiva a los espermatozoides que tiene movimiento pero de manera oscilatorio o in situ
- La fórmula que se usó para determinar los valores fue una regla de 3:

$$\% \text{ de Espermatozoides con traslación Progresiva} = \frac{\# \text{ de espermatozoides con Traslación Progresiva} \times 100}{\sum \text{ total de espermatozoides móviles}}$$

$$\% \text{ de Espermatozoides con traslación no Progresiva} = \frac{\# \text{ de espermatozoides con Traslación no Progresiva} \times 100}{\sum \text{ total de espermatozoides móviles}}$$

h. Determinación y cálculo de la morfología estricta (Kruger 2010)

- Se coloca una gota (10µL) de semen en un porta objeto, se realiza un frotis en la placa para extender la muestra por toda la superficie y se lo deja secar. Fig.5

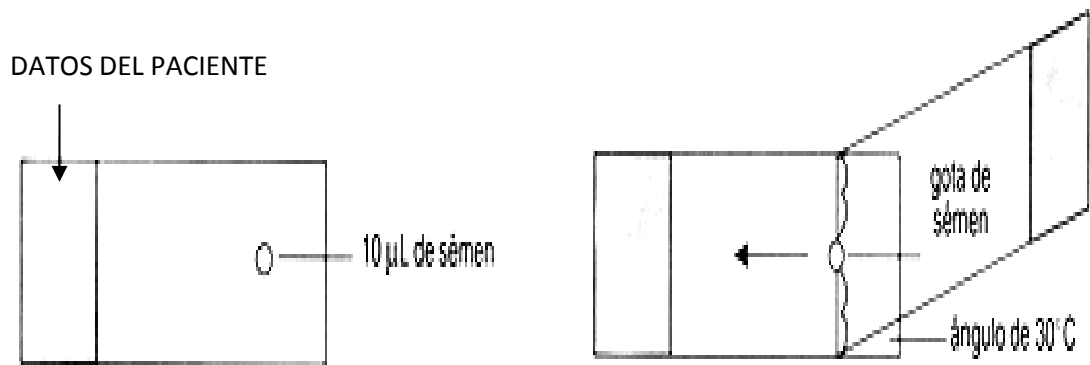


Figura 5 Demostración del frotis de la muestra de semen en la placa porta objeto

- La fijación y la tinción se la realiza utilizando el Kit de tinción Diff – Quick (DADE) (Microptic, n.d.) (Anexo 4).
 - En todas estas etapas se sumerge por 10 segundos la placa, iniciando en solución de metanol al 95%, después en la solución fijante y luego en la de tinción, por último se lava la placa con agua destilada y se la dejó secar a temperatura ambiente.
- Se observa al microscopio invertido con un lente de 10X y objetivo de 40X, se identifica los espermatozoides morfológicamente sanos (Anexo 5) y deformes (Anexo 6 y 7), luego se clasifica los deformes de acuerdo al tropismo estructural donde existe la degradación de la célula (Cabeza, Cuello y, Cola).

- Para validar el test morfológico la muestra debe contener una concentración mínima [100 cél/mL].
- La ecuación para determinar los valores fue una regla de 3:

$$\% \text{ de espermatozoides Sanos} = \frac{\# \text{ de espermatozoides Sanos} \times 100}{\sum \text{ total de espermatozoides (Sanos y Deformes)}}$$

$$\% \text{ de espermatozoides Deforme (Cabeza)} = \frac{\# \text{ de espermatozoides Deformes Cabeza}^* \times 100}{\sum \text{ total de espermatozoides (Sanos y Deformes)}}$$

La variable biológica de ajuste en el Numerador * para todas las ecuaciones se reemplaza por el valor que desea conocer: Cabeza, Coello, Cola e Inmaduro

6.7. Métodos: SCD Test

Protocolo-Fase Pre analítica (Anexo 8)

- Alícuotar 100µL de la muestra.
- Se congelan las placas que vienen dentro del Kit a 2°C por 24 horas antes de realizar la prueba.
- Para iniciar el test, la muestra de semen debe tener una concentración de espermatozoides no menor [5 x 10⁶/mL], luego se realizan diluciones seriadas.
- Se debe preparar 5 mL de medio HTF con HEPES al 10% de Albúmina (4.5 ml del medio con 0.5 ml de albumina). Este se mantiene a 37°C para su uso.

Preparación de la Agarosa

- Calentar el tubo de agarosa a 80 °C por 25 minutos. (Anexo 9)
- Luego de esto se lo introdujo en una incubadora a 37°C por 5 minutos. (Anexo 10)

Preparación de la muestra.

- Se retira la agarosa de la incubadora y se coloca dentro de la cabina de flujo laminar con la alícuota de la muestra previamente obtenida. (Anexo 11)
- Se retira 60 µL de la muestra y se lo coloca dentro del tubo de la agarosa y se homogeniza con pipeta.
- De la mezcla se extrae 30µL y se deposita en la placa previamente enfriada para luego colocar de manera inclinada el cubreobjetos.
- Enfriar la placa al congelador por 5 minutos a una temperatura de 2°C.
- Se retira el cubreobjetos deslizándolo cuidadosamente para no alzarlo.

Proceso de Lisado

- Introducir la placa en LA SOLUCIÓN A por 7 minutos. (Anexo 12)
- Introducir la placa en LA SOLUCIÓN B por 25 minutos. (Anexo 13)

Lavado de la placa

- Sumergir en Agua destilada por 5 minutos. (Anexo 14)
- Secar.
- En esta etapa se sumerge durante 2 minutos por cada solución la placa a distintos niveles de concentración de Etanol (70%, 90%, 100%). (Anexo 15).
- Secar la placa por completo.

Tinción (Anexo 15)

- Se añade 15 gotas de tinción de Wright. (Anexo 16)
- Se añade 30 gotas de buffer de Wright. (Anexo 17)
- Se retira el excedente de la tinción y el buffer
- Se lo deja secar (Fernandez et al., 2003)

6.8. Pruebas estadísticas:

Para los análisis se aplicaran ANOVA (paramétrica o no paramétrica), X^2 , Spearman y KRUSKAL WALLIS los programas utilizados serán SPSS, MedCALC, e Info Stat

Capítulo IV

7. Resultados

7.1. Categorización de la muestra

En el marco del estudio taxativo molecular de la fragmentación del ADN espermático, primero se determinaron los grupos etarios a partir de 75 individuos, como sigue a continuación: (I) 25-31, (II) 32-37, (III) 38-43, (IV) 44-49, (V) 50-56.

Subsiguientemente, se establece una segunda selección previa; para tomar la población final de individuos candidatos para el desarrollo de este trabajo; para ello se consideraron los criterios de inclusión (I) y exclusión (E); pacientes que no forman parte para la prueba. Como resultado de la discriminación de los pacientes el 57% (43/75) fueron para I; mientras que para E fue del 43% (32/75). (Fig. 6).

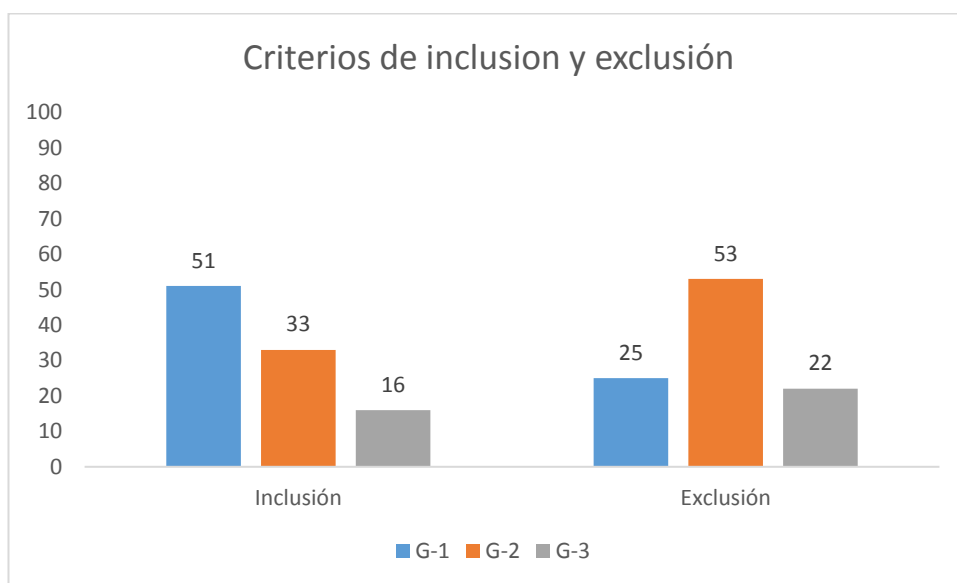


Figura 6. Datos porcentuales que demuestran la formación de los grupos de Inclusión y Exclusión para el estudio. G1= grupo 1; G2=grupo 2; G-3=grupo 3

En la figura anterior se observan los grupo de evaluación, distribuidos para I: G-1 51% (22/43), G-2 33% (14/43), y G-3 16% (7/43) que corresponden al 57% (43/75) del global, el mayor porcentaje de pacientes para realizar la prueba es G1. Los porcentajes de excluidos son G-1: 25% (8/32), G-2: 53% (17/32), G-3: 22% (7/32), correspondiendo el 43% (32/75) del global.

Por otro lado, una vez logrado la evaluación y selección de los individuos de Inclusión; se establecieron finalmente cuatro grupos (G) para este estudio: G-1: Pacientes que laboran en zonas cerradas; G-2: Pacientes que laboran en espacios abiertos; G-3: Pacientes con hábitos de fumar y, G-4: Grupo control (donadores). Los grupos que fueron sometidos a la prueba SCD fueron el G1, G2 y G3.

Como resultado del coalescen de la muestra, los grupos se retrajeron por la edad, con el objetivo de conocer su dispersión y ubicación en el diagrama. Para esto, se observa que los rango de edad en G-1 (25 a 52), G-2(28-50), G-3(25 a 49) y G-4 (28-57), el promedio de edad se ubica entre los 38 años. Para la examinación y evaluación de los pacientes se seleccionó los grupos etarios (II) 32-37 y, (III) 38- 43 años. Fig.7

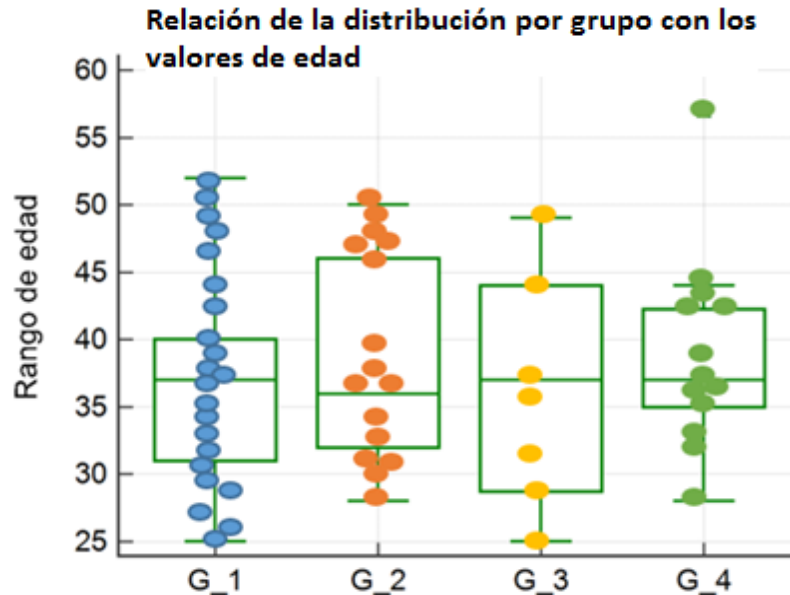


Figura 7 Relación de la distribución de los grupos G-1, G-2, G-3 y G-4 con los valores de edad: Celeste=G-1, Ladrillo=G-2, Amarillo =G-3, Verde=G-4.

Por otro lado, como prueba complementaria y previa a la SCD; se examinaron los Factores de Incidencia Intergénica (FII) enmarcadas en la Edad, Varicocele, Papera, Enfermedades Oncológicas, Celular en el Bolsillo y Medicación.

Para los datos de los Factores de Incidencia Intergénica (FII), sometidos a Sperman ($p=0,05$), las correlaciones obtenidas se las clasifico en fuertes y, moderadas; las correlaciones más fuerte la presento el G-3 (Fumadores) con 0,9 y -0,6. Mientras que para los grupos 1 y 2 la correlación máxima fue de 0,5 para cada uno; lo que sugiere que los FII analizados, inciden en los pacientes de los tres grupos y, variando de manera intraespecífica (Tabla1).

Tabla 1

Correlación de los Factores de Incidencia Intergénica (Sperman $p=0,05$) en G-1, G-2 y, G-3.

Grupo	Factores de Incidencia Intergénica (FII)		Coefficiente de correlación
G-3	Edad	Medicamento	**0,9
G-3	Edad	Uso de Celular	** -0,6
G-3	Uso de Celular	Medicamento	** -0,5
G-3	Edad	Varicocele	*-0,4
G-3	Papera	Uso de Celular	*0,4
G-3	Papera	Varicocele	*-0,4
G-3	Medicamentos	Varicocele	*-0,4
G-2	Varicocele	Uso de Celular	** -0,5
G-2	Varicocele	Medicamento	**0,5
G-2	Uso de Celular	Medicamento	*-0,4
G-2	Edad	Medicamento	*0,3
G-2	Papera	Varicocele	*0,3
G-1	Edad	Uso de Celular	** -0,5
G-1	Edad	Medicamento	*0,4
G-1	Uso de Celular	Medicamento	*-0,3

**Fuerte; *Moderada.

La tabla 1 además demuestra la formación de tres Grupos con los FII, los mismos que tuvieron coeficiente de correlación tanto positiva como negativa; se excluyó los factores que tenían débil o ninguna correlación entre ellos. Se observa que el factor con mayor predominancia es el de medicamentos con 27%, el uso de celular con 23%, edad y varicocele con 20% cada uno y, por ultimo papera con el 10%. Al cotejamiento, la combinación que tuvo mayor afinidad fue la edad con los medicamentos con $p= 0,9$ lo que indica que el uso de medicamentos aumenta con la edad, seguido por la edad con el uso de celular con $p= -0,6$; este último demuestra que el uso del celular disminuye a medida que el individuo envejece.

La afinidad intermedia de los tres grupos analizados estuvo entre el uso del celular con los medicamentos $p=0,5$; varicocele con uso de celular con $p=-0,5$ y, por último el varicocele con medicamento $p=0,5$.

Los coeficientes más fuertes por grupos y, frente a los FII se encontraron en el G-3 con la edad y medicamento $p= 0,9$; G-2 varicocele y uso de celular $p=-0,5$ y G-1 con edad y uso de celular $p=-0,5$.

Para determinar y, evidenciar diferencias estadísticas entre las lesiones de la Morfo Estructura Espermática (MEE) en cada uno de los grupos, se analizó con χ^2 ; ($p=0,05$), de esta prueba se logró obtener que al cotejamiento no había una diferencia significativa entre ellas.

Tabla 2

Análisis de afinidad |Sperman ($p=0,05$) de las Morfo Estructura Espermática de los G-1, G-2 y G-3.

Grupos	Edad	Parámetros Morfológicos (MEE)		Coefficiente de Correlación
G-1	32-37	Lesión en Cabeza	Lesión en Cuello	-0,78
		Lesión en Cabeza	Lesión en Cola	-0,81
	50-56	Espermatozoides Sanos	Lesión en Cabeza	-1,00
		Espermatozoides Sanos	Lesión en Cuello	-1,00
		Lesión en Cuello	Lesión en Cabeza	1,00
		Lesión en Cola	Lesión en Cabeza	-1,00
		Lesión en Cola	Lesión en Cuello	-1,00
G-2	25-31	Espermatozoides Sanos	Lesión en Cabeza	-1,00
		Espermatozoides Sanos	Lesión en Cuello	0,87
		Lesión en Cabeza	Lesión en Cuello	-0,87
		Lesión en Cola	Inmaduros	1,00
G-3	32-37	Espermatozoides Sanos	Lesión en Cuello	-0,92
	25-31	Espermatozoides Sanos	Lesión en Cabeza	-1,00
		Espermatozoides Sanos	Lesión en Cola	1,00
		Lesión en Cabeza	Lesión en Cola	-1,00
	44-49	Lesión en Cabeza	Espermatozoides Sanos	-1,00
		Lesión en Cabeza	Lesión en Cuello	-1,00
		Lesión en Cuello	Espermatozoides Sanos	1,00
		Lesión en Cola	Espermatozoides Sanos	-1,00
		Lesión en Cola	Lesión en Cabeza	1,00
		Lesión en Cola	Lesión en Cuello	-1,00

** Muy Fuerte; *Fuerte.

En la tabla 2, se pueden observar de mayor a menor que los MEE con mayor frecuencia hallado es la Lesión de cabeza con el 29%, seguido por Espermatozoides sano y lesión en cuello (24% cada uno), lesión de cola 21% e inmaduros 2%.

Las correlaciones de los MEE de cada grupo con relación a la edad determinó que el 76% tuvieron una correlación de $p=+1,-1$ y; una correlación del 24%, no se incluyeron las correlaciones moderadas o débiles dentro del cuadro.

7.2. Análisis por Componentes Principales de los factores externos con la calidad de los espermatozoides.

En lo macro, se cotejaron datos por Anova ($p=005$) y, X^2 ($P=005$); el grupo testigo versus el de pacientes infértiles; asistiendo para el análisis las MEE. En cuanto a las MEE no se encontraron diferencias significativas $P= <0,05$, esto sugiere que las MEE no pueden ser tomados como criterios tempranos para la discriminación de pacientes con perfil de infertilidad.

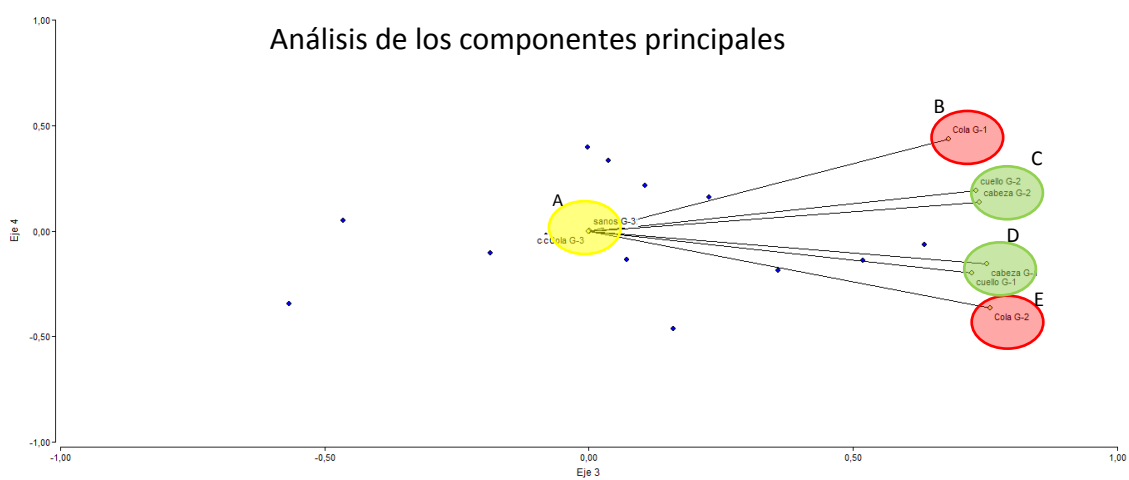


Figura 8 Análisis de los componentes principales las MEE por los tres grupos; A= G-3 (espermatozoides Sanos y deformes en cola), B= G-1 (deformes en cola), C= G-2 (deforme cabeza y cuello), D= G-1 (deformes en cabeza y cuello), E= G-2 (deforme en cola).

Subsiguientemente, se trataron los datos para determinar la robustez de asociación de las MEE, para ello se realizó el análisis multivariado por Biplot y ARM. Se logra observar la formación de tres grupos en asociación, siendo el G-3 el que forma la partida con el criterio sano y defecto en cola, la asociación se la examina como directa. Por otro lado, se destaca que el G-2; se asocia de manera robusta con la deformidad en cabeza y cuello; sin embargo el defecto en cola difiere drásticamente de los dos antes citados. Para el G-1, existe una asociación positiva entre defecto de cabeza y cuello, también se consigue observar una alta plasticidad negativa respecto al defecto en cola.

Fig. 10

7.3. Determinación del IDF por SCD

De acuerdo a estos resultados, se describe una distribución conformacional de cuartiles acoplados para la descripción de estos resultados (Q1= 25%; Q2= 50% y Q3= 25%) para los tres grupos, siendo para G-1, al Q1- (3,9 a 7), Q2- (8 a 23), Q3- (27 a 50) en D(x)= 19; siendo para G-2, al Q1- (5,4 a 6), Q2- (8 a 23), Q3- (27 a 50) en D(x)=22; y por último el G-3, al Q1- (9 a 11), Q2- (14,1 a 26), Q3- (40,6 a 50) en D(x)=24 Tabla 3. De acuerdo a χ^2 (p=0,01), se determinó que no existía una diferencia significativa entre los tres grupos analizados.

Tabla 3
Rango de Cuartiles del IDF por grupo

Grupos	Q 1	Q2	Q 3	D(x)
G-1	3,9 - 7	8 - 23	27 - 50	19
G-2	5,4 - 6	8 - 23	29,3 - 83	22
G-3	9 - 11	14,1 - 26	40,6 - 50	24

Tabla 4
Porcentaje de cada grupo dentro de los rangos del IDF

Rangos (CeFeGen, 2018)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<15% IDF	45% (10/22)	43% (6/14)	42%(3/7)
>15 a <30% IDF	37% (8/22)	43%(6/14)	29%(2/7)
>30% IDF	18%* (4/22)	14%*(2/14)	29%*(2/7)

*Porcentaje de pacientes con mayor (IDF).

El IDF de la tabla 4 muestra que la población con mayor incidencia negativa para este criterio se encasilla en el G-3; con del 29% de las muestras; seguido por el G-1 con el 18% y el G-2 con el 14%. Este rango >30% IDF; demuestra de manera conjeturada que si el paciente cae en este cuadro, la patología de infertilidad basada en esta prueba asigna de manera directa a que el paciente tiene carencia de fertilidad. Mientras que los pacientes que se ubican en la casilla de >15 a <30% de IDF, demuestran que un 43% de

ellos está representada por el G-2, seguido de G-1 y G-3 (37 y 29% respectivamente); este rango permite a los pacientes a prever tratamientos para la inducción de viabilidad espermática, no asistiendo a esto, perfilan a caer en el cuadro clínico de infertilidad. Para los pacientes que se enmarcan en los rangos de <15% de IDF, se determina que la población presenta una homogeneidad de los datos, siendo así 42,43 y 45% para G-3,2 y 1. De acuerdo a estos hallazgos y, a los reportados; esta técnica puede permitir ayudar potencialmente a discriminar a los MEE de los SCD, lo que demuestra que de 75 pacientes 42 son considerados infértiles bajo esta examinación.

7.4. Correlación grupal de las Morfo Estructuras Espermáticas y la Dispersión de la Cromatina Espermática

De acuerdo a los datos complementarios de los cotejamientos $\bar{x}$, G-1 representa el 14% de sanos, siendo este el más alto en relación a los dos grupos contrastantes (G-2 10% y G-3 11%). De acuerdo a la deformidad total; G-2 es el que presenta el valor más alto con el 90% seguido por G-3 (89%) y G-1 (86%). Para la fragmentación G-1 es el menor con el 19% seguido por G-2 (23%) y G-3 (24%). (Figura 11)

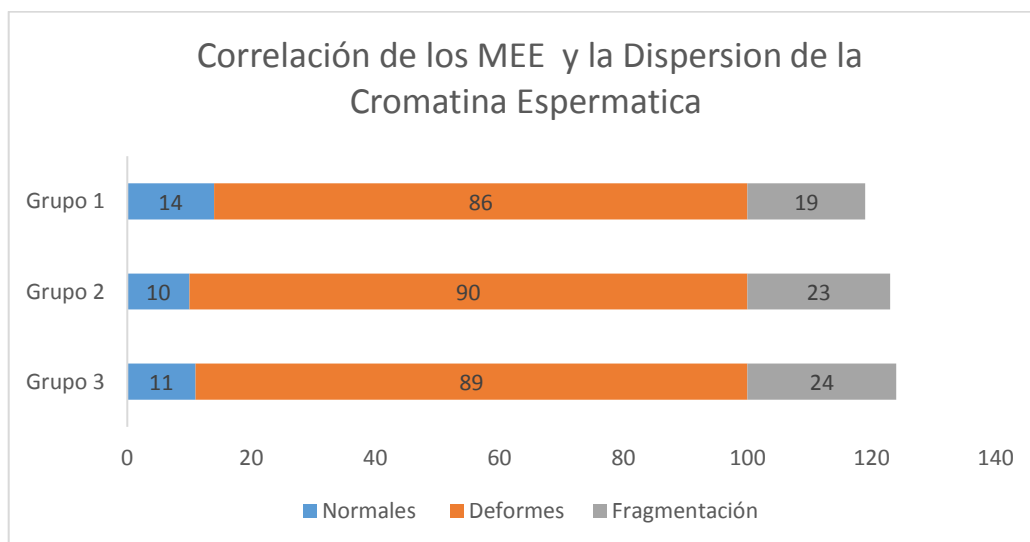


Figura 9 Porcentaje $\bar{x}$ de la degradación espermática; Azul= espermatozoides sanos. Ladrillo= deformes. Gris= Fragmentación.

Subsiguientemente, se estableció para los tres grupos el cotejamiento entre la fragmentación frente a los de MEE, para ello se utilizó Sperman ($p=0,05$). Los

resultados determinaron que el G-3 tuvo una correlación positiva ($p= 1$) entre los niveles de deformidad frente a la fragmentación.

8. Discusión

En el marco de este trabajo se logró obtener datos claros en la aplicación de la prueba de SCD, además de las MEE; siendo la primera una herramienta eficiente para determinar la variabilidad del ADN de las células espermáticas.

Los resultados demostrados aquí sobre la afectación que se obtuvieron en cada grupo de estudio, fueron contrastados con otros reportes; para esto se concuerda con lo publicado por Bosco et al., (2018), quien junto a sus colaboradores demostraron que el nivel de contaminación atmosférico incide de manera indirecta sobre la condición normal de las espermátidas; además se concatenan ciertamente con las condiciones evaluadas y los porcentajes de fragmentación.

De acuerdo a los datos reportados por Mostafa et al., (2017) los pacientes que no fuman tuvieron un nivel intermedio de fragmentación y, los fumadores un nivel alto. Los datos que se registraron en este trabajo demuestran que la fragmentación del ADN para los dos grupos fue similares en comparación a los niveles registrados.

Se determinó que los daños asociados con la morfología de los espermatozoides; son indicadores de interés; debido a que la examinación previa arroja datos prospectivos para evaluar la condición de la fertilidad, los estudios publicados por Lingappa et al., (2015) y colaboradores; demostraron que el estado de la cola es un criterio que sirve para medir la viabilidad del espermatozoide, la tendencia fue menor en ambos trabajos; alcanzando una similitud en los pacientes fumadores.

En cuanto a los parámetros seminales; el trabajo reportado por Cutié et al., (2016.), quienes demuestran la incidencia de los factores medioambientales sobre las personas

que realizan la actividad de chofer, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo con pacientes que reportaron la misma condición laboral.

De acuerdo a Wdowiak, Bakalczuk, & Bakalczuk, (2015), el plomo del medio ambiente puede incidir negativamente sobre la degradación del ADN en pacientes con pre disposición genética a la infertilidad, según los datos sostenidos en este trabajo y los reportados, la pérdida de viabilidad de los espermatozoides en ambos trabajos presentaron similitud en el perfil clínico, lo que demuestra un mismo patrón de comportamiento celular.

Datos reportados por Quintero–Vásquez et al., (2015), demostraron que los daños a nivel del ADN pueden ser provocados por la combinación directa e indirecta de los factores físicos-químicos o la interacción con agentes etiológicos que provocan las enfermedades de transmisión sexual (ETS), los datos presentados en este estudio y, el antes citado confirman una correspondencia positiva sobre este criterio.

Para el desarrollo de este trabajo se presentaron dos limitantes, la primera se enfoca en la implementación de la prueba, en vista que en este laboratorio es nova. Por otro lado, estuvo el número de muestras; esto es debido a la alta tasa de discriminación de las muestras por MEE y, por lo consiguiente al escaso número de pacientes que llegaron a la etapa de realizarse la prueba del SCD.

9. Conclusiones

- El grupo de los Fumadores tuvieron un nivel de afectación mayor debido a factores de Incidencia Intergénica y el porcentaje de fragmentación que los demás.
- El Grupo control, G-4 solo tuvo diferencia con los grupos G-1 G-2 G-3, en las morfoestructuras al nivel de la deformidad en cola.
- Menos de la mitad de los pacientes estudiados tuvieron un índice de fragmentación alto para poder considerarlos infértil por la degradación del ADN.

10. Recomendaciones

- Se recomienda aumentar el número de pacientes para poder tener un mejor resultado al momento de validarlo estadísticamente.
- Se sugiere relacionar más parámetros seminales para poder tener una correlación entre ellos y los niveles de fragmentación.
- Se considera comparar la técnica usada con otra comercial para poder determinar la sensibilidad

11. Referencias bibliográficas

- Abad inés, Deba Shuyana, & Del Rio Javier. (2016). Efectos de las radiaciones electromagnéticas en la fertilidad masculina. Retrieved June 6, 2018, from <https://invitrosperm.blogspot.com/2016/01/efectos-de-las-radiaciones.html>
- Adam. (2018). Translocación: MedlinePlus enciclopedia médica. Retrieved August 8, 2018, from <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002330.htm>
- Antonio Requena. (2013). La tasa de infertilidad llega al 17 por ciento de la población y seguirá al alza. Retrieved August 5, 2018, from <https://www.efesalud.com/la-tasa-de-infertilidad-llega-al-17-por-ciento-de-la-poblacion-y-seguira-al-alza/>
- Bosco, L., Notari, T., Ruvolo, G., Roccheri, M. C., Martino, C., Chiappetta, R., ... Montano, L. (2018). Sperm DNA fragmentation: An early and reliable marker of air pollution. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 58(February), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.02.001>
- CeFeGen. (2018). Fragmentación del ADN: Infertilidad en el varón. Retrieved June 3, 2018, from <https://cefegen.es/fragmentacion-adn-espermatico-test-espermatozoides-calidad>
- Celeste, M. (2016). espermatozoides de mamíferos : estudio de su mecanismo molecular y su posible utilidad como bioindicador del efecto de disruptores endócrinos.
- Center for Woman's Health. (2015). Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). Retrieved August 7, 2018, from <https://www.ohsu.edu/xd/health/services/women/services/fertility/fertility-services/lab-services/sperm-chromatin-structure.cfm>
- Chohan, K. R., Griffin, J. T., Lafromboise, M., De Jonge, C. J., & Carrell, D. T. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology*, 27(1), 53–59. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05068>

- Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W. G., Behre, H. M., ... Vogelsong, K. M. (2009). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16(3), 231–245. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048>
- Cortés-Gutiérrez, E., Dávila, M., López-Fernández, C., Fernández, J., & Gosálvez, J. (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*, 31(2), 120–131. [https://doi.org/10.1016/S0210-4806\(07\)73609-4](https://doi.org/10.1016/S0210-4806(07)73609-4)
- Cutié, B., Nápoles, A. U., & Fabars, A. D. (n.d.). ESPERMATOGRAMA. 2016, 1–17.
- Dorado Silva, M., Migueles, B., González, M., Hebles, M., Aguilera, L., Sánchez, P., ... Cruz, N. (2008). Relación entre los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático. *Revista Internacional de Andrología*, 6(1), 14–17. [https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(08\)72561-5](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(08)72561-5)
- E, S. L., & Jj, L. (2017). Fragmentación del ADN espermático : situación actual Sperm DNA fragmentation : Current, 85(3), 164–189.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Baer, R. K., Turner, T. W., & Schrader, S. M. (1991). Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Toxicology*, 5(2), 115–125. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(91\)90039-I](https://doi.org/10.1016/0890-6238(91)90039-I)
- Fernandez, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, 24(1), 59–66. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x>
- Flaherty, C. O. (2014). Genetic Damage in Human Spermatozoa, 791, 117–135. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7783-9>
- Fraczek, M., Szumala-Kakol, A., Dworacki, G., Sanocka, D., & Kurpisz, M. (2013). In vitro reconstruction of inflammatory reaction in human semen: Effect on sperm DNA fragmentation. *Journal of Reproductive Immunology*, 100(1), 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.09.005>
- Fundación Futuro Latinoamericano (FFLA). (2015). *Proyecto Huella de Ciudades: Resultados Estratégicos y Guía Metodológica*.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119(3), 493–501. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.3.493>
- Gupta, N., Pentakota, S., Mishra, L. N., Jones, R., & Rao, M. R. S. (2017). *Identification of Posttranslational Modifications of Endogenous Chromatin Proteins From Testicular Cells by Mass Spectrometry. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 586). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.09.031>

- Harlev, A., Agarwal, A., Gunes, S. O., Shetty, A., & du Plessis, S. S. (2015). Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. *The World Journal of Men's Health*, 33(3), 143. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2015.33.3.143>
- Hill, M. A., O'Neill, P., & McKenna, W. G. (2016). Comments on potential health effects of MRI-induced DNA lesions: quality is more important to consider than quantity. *European Heart Journal – Cardiovascular Imaging*, 17(11), 1230–1238. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jew163>
- Innaifest. (2017). Fragmentación ADN de espermatozoides. Retrieved August 7, 2018, from <http://www.innaifest.com.ec/examen-fertilidad/fragmentacion-adn-de-espermatozoides>
- Instituto BERNABEU. (2018). Estudio de Fertilidad. Retrieved August 3, 2018, from <https://www.institutobernabeu.com/es/ib/estudio-de-fertilidad/>
- Ivan Ochoa. (2012). Parámetros de Calidad Seminal según la Organización Mundial de la Salud (OMS) - Foro de Instituto Bernabeu. Retrieved August 3, 2018, from <https://www.institutobernabeu.com/foro/calidad-seminal-segun-la-organizacion-mundial-de-la-salud-oms/>
- Jalón Monzón, A., Martín Benito, J. L., Álvarez Múgica, M., García Rodríguez, J., Fernández Gómez, J. M., Viña Alonso, L., & Jalón Monzón, M. (2006). Infertilidad masculina. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 32(5), 223–232. [https://doi.org/10.1016/S1138-3593\(06\)73261-0](https://doi.org/10.1016/S1138-3593(06)73261-0)
- Jose Ortiz. (2014). CCS (Comprehensive Chromosome Screening) y esterilidad de causa desconocida - Foro de Instituto Bernabeu. Retrieved August 3, 2018, from <https://www.institutobernabeu.com/foro/ccs-comprehensive-chromosome-screening-y-esterilidad-de-causa-desconocida/>
- Lingappa, H. A., Govindashetty, A. M., Puttaveerachary, A. K., Manchaiah, S., Namurthy, A. K., Bashir, S., & Doddaiiah, N. (2015). Evaluation of effect of cigarette smoking on vital seminal parameters which influence fertility. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(7), EC13-EC15. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13295.6227>
- Malvezzi, H., Sharma, R., Agarwal, A., Abuzenadah, A. M., & Abu-Elmagd, M. (2014). Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 12(1), 121. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-121>
- Manuel, J., & Herrera, H. (2010). EVALuACIóN dE LA TrANSLuCENCIA dEL pLIEGuE NuCAL EN LA dETECCIóN dE ANEupLoIdIAS, (594), 385–390.
- Marotte, C., & Zeni, S. N. (2013). Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas *. *Bioquímica Clínica*, 47(4), 661–664.

- Martínez-Frías, M. L. (2010). Actualización de conocimientos sobre formación de los gametos. Procesos de meiosis y fecundación. *Semergen*, 36(4), 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2009.12.013>
- Microptic. (n.d.). Protocol: Diff-Quik®, 1. Retrieved from <http://www.micropticsl.com/>
- Ministerio del Ambiente. (2014). Inventario Preliminar de las Emisiones de Contaminantes del Aire , de los cantones Ambato , Riobamba , Santo Domingo de los Colorados , Latacunga , Ibarra , Manta , Portoviejo , Esmeraldas y Milagro, 3, 124. Retrieved from <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/05/Libro-Resumen-Inventario-13-02-2014-prensa.pdf>
- Mostafa, R. M., Nasrallah, Y. S., Hassan, M. M., Farrag, A. F., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2017). The effect of cigarette smoking on human seminal parameters, sperm chromatin structure and condensation. *Andrologia*, (August), e12910. <https://doi.org/10.1111/and.12910>
- NHGRI. (2016). National Human Genome Research Institute. Retrieved August 8, 2018, from <https://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=45>
- OMS. (2018). Calidad del aire ambiente (exterior) y salud. Retrieved August 7, 2018, from [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
- OPS OMS. (2016). Contaminación del Aire Ambiental. Retrieved August 5, 2018, from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12918%3A2017-ambient-air-pollution&catid=2619%3Aenvironmental-health&Itemid=42246&lang=es
- Portella, J., López, R., Noriega-Hoces, L., & Guzmán, L. (2013). Modelo predictivo de fragmentación de ADN espermático usando parámetros evaluados en un espermatograma. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 60(1), 21–28. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322014000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Quintero-Vásquez, G. A., Bermúdez-Cruz, R. M., & Castillo-Cadena, J. (2015). Infertilidad Masculina Y Fragmentación Del Adn Espermático: Un Problema Actual. *Tip*, 18(2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.006>
- Ranganathan, P., Rao, K. A., Sudan, J. J., & Balasundaram, S. (2018). Cadmium effects on sperm morphology and semenogelin with relates to increased ROS in infertile smokers: An in vitro and in silico approach. *Reproductive Biology*, (January), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.04.003>
- Reus Rebeca. (2017). Fases de la espermatogénesis. Retrieved June 13, 2018, from

<https://www.reproduccionasistida.org/espermatogenesis/>

Rose, T., Felipe, A., Siqueira, P., Castro, L. S. De, Mendes, C. M., Delgado, J. D. C., ... Ávila, O. D. (2018). Effect of Heat Stress on Sperm DNA : Protamine Assessment in Ram Spermatozoa and Testicle, 2018.

Rubes, J., Selevan, S. G., Sram, R. J., Evenson, D. P., & Perreault, S. D. (2007). GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 625(1–2), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.05.012>

Sakkas, D., & Álvarez, J. (2011). Fragmentación del ADN espermático: mecanismos de origen y su repercusión en los resultados reproductivos y análisis. *Revista Mexicana de Medicina de La Reproducción*, 3(4), 160–175.

Salvador Zaira. (2018). Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. Retrieved June 3, 2018, from <https://www.reproduccionasistida.org/fragmentacion-adn-semen/>

Sharma, R., Masaki, J., & Agarwal, A. (2013). Spermatogenesis, 927, 121–136. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0>

Simon, L., & Carrell, D. T. (2013). Spermatogenesis, 927, 137–146. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0>

Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*, 6(11), 8474–8490. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3523>

Verbrugge, I., Johnstone, R. W., & Smyth, M. J. (2010). SnapShot: Extrinsic apoptosis pathways. *Cell*, 143(7), 1192–1192.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.004>

Wdowiak, A., Bakalczuk, G., & Bakalczuk, S. (2015). Evaluation of effect of selected trace elements on dynamics of sperm DNA fragmentation. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 69, 1405–1410. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27259212>

12. Anexos

Anexo 1

Nombre:		Fecha:	
Edad:	Estatura:	Peso:	Cédula de Identidad:
Hora Toma de Muestra:	Días de Abstinencia:		Fecha Última Eyaculación:
Hora Entrega de Muestra:			Hora Aproximada:
¿Hubo pérdida de parte de la muestra en el momento de la recolección? ¿Tuvo episodios de fiebre, malestares el día previo a la toma de muestra? ¿Tuvo ejercicios físicos y/o deportivos prolongados el día anterior a la toma de muestra? ¿Durmió la noche previa a la toma de muestra, 6 a 8 horas (o más)?			Eyaculaciones por semana:
Hijos: SI ☐ NO ☐ Edad de sus hijos:		Antecedentes de infertilidad familiar:	
Ciudad de Nacimiento:		Ciudad de residencia:	
Actividad Laboral:		¿Sus actividades involucran el uso "directo" de alguno de los siguientes compuestos? ☐ Combustibles ☐ Químicos industriales ☐ Productos químicos agrícolas Nombre del producto: _____	
¿Paperas? SI ☐ NO ☐	¿Varicocele? SI ☐ NO ☐	Enfermedad oncológica: SI ☐ NO ☐	
Edad padecimiento:	¿Fue operado? SI ☐ NO ☐	Tipo de cáncer:	
Diabetes: SI ☐ NO ☐	Fecha operación:	Tratamiento:	
Edad de Diagnóstico:	Enfermedad Genética: SI ☐ NO ☐	Fecha último tratamiento:	
¿Fuma? SI ☐ NO ☐	Actividad deportiva: SI ☐ NO ☐	¿Utiliza su Celular en bolsillo delantero del pantalón? SI ☐ NO ☐	
Cigarrillos x semana:	¿Cuál?:	Horas diarias:	
Bebidas alcohólicas: SI ☐ NO ☐	Horas por semana:	Días por semana:	
Consumo x semana:	Días x Semana:		

Formulario masculino

¿Ha padecido o padece alguna enfermedad o accidente que considere pudo o puede afectar su fertilidad?: SI ☐ NO ☐	
¿Cuál?:	
¿Recibe o recibió tratamiento?	¿Qué Tratamiento?:
Fecha inicio tratamiento:	Fecha de último tratamiento:
¿Toma medicamentos actualmente de manera continua? SI ☐ NO ☐ ¿Cuáles?:	
Dosis por semana:	Tiempo que lleva medicado:
Haga algún comentario que considere importante referente a la evaluación de su fertilidad:	
Teléfono convencional:	Celular:
Nombre de su pareja:	Dr. que Refiere:
Correo electrónico:	Firma:

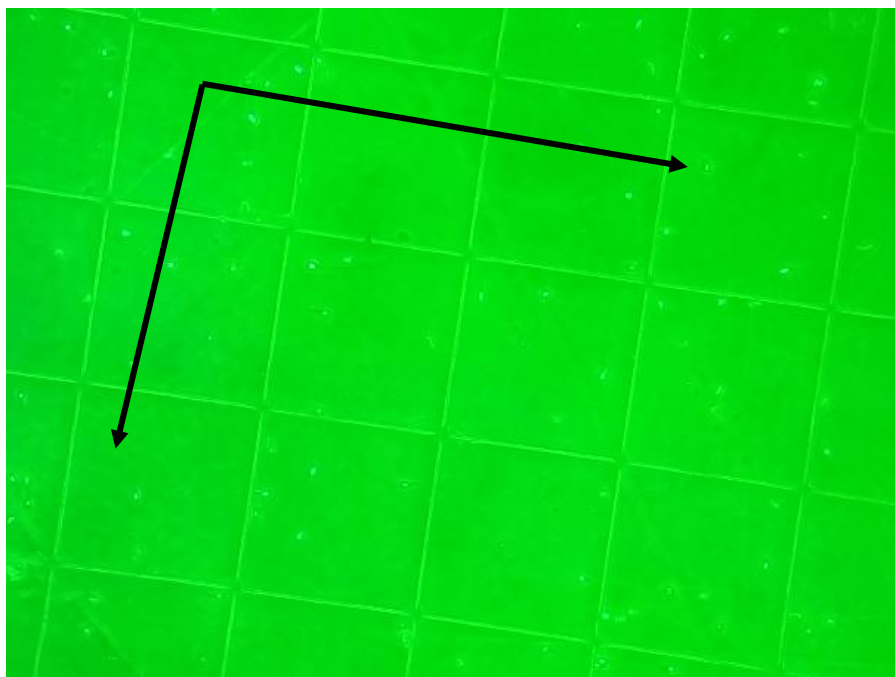
Final del documento ■

Anexo 2



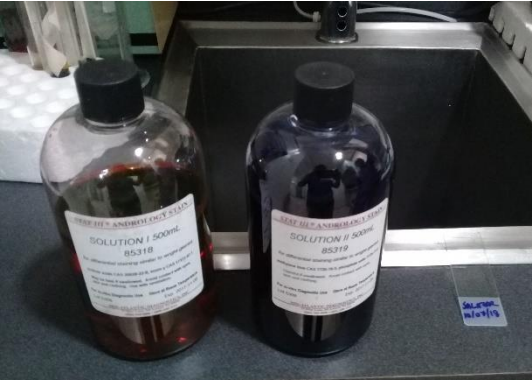
Cámara de Makler

Anexo 3



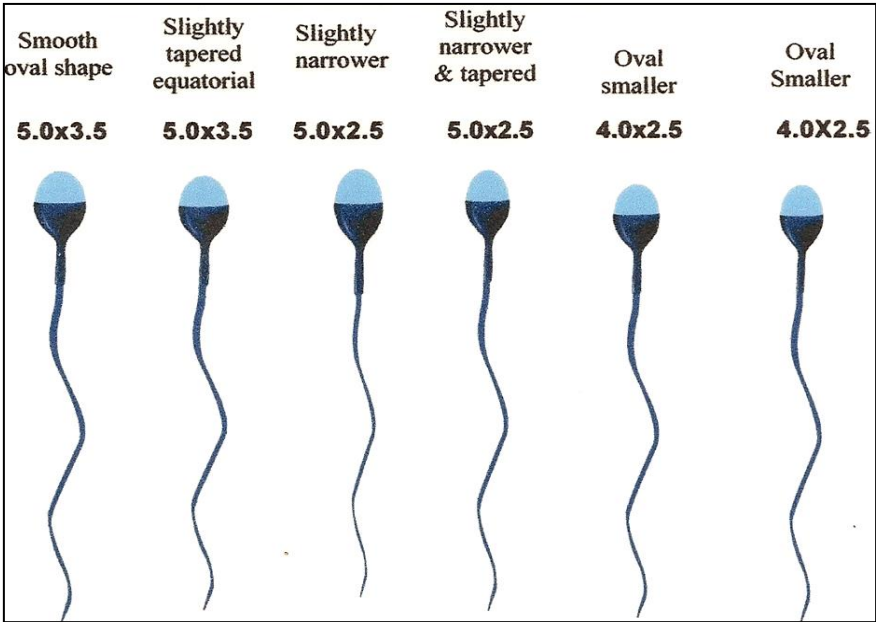
Observación con los espermatozoides en la cámara de Makler

Anexo 4



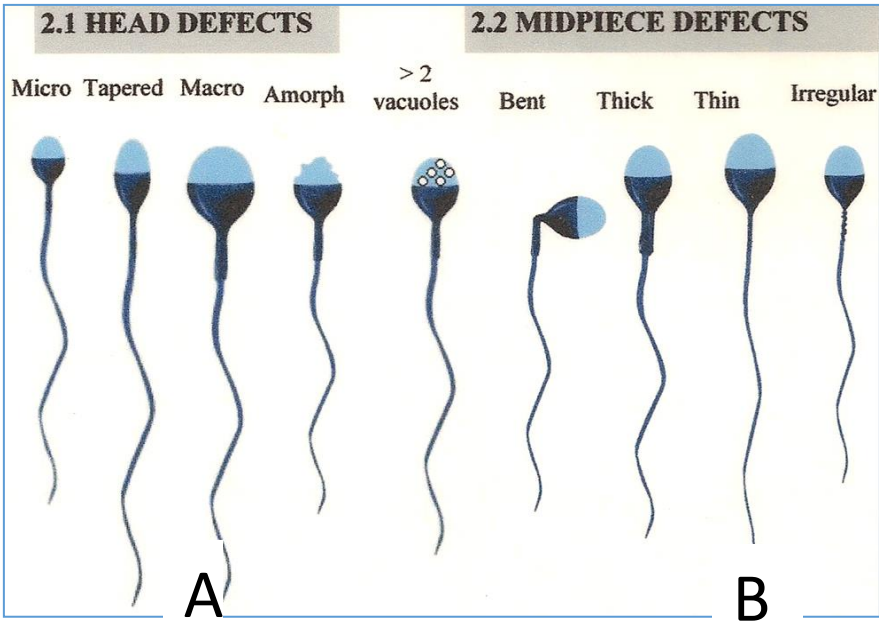
1kit de tinción Diff – Quick (DADE)

Anexo 5



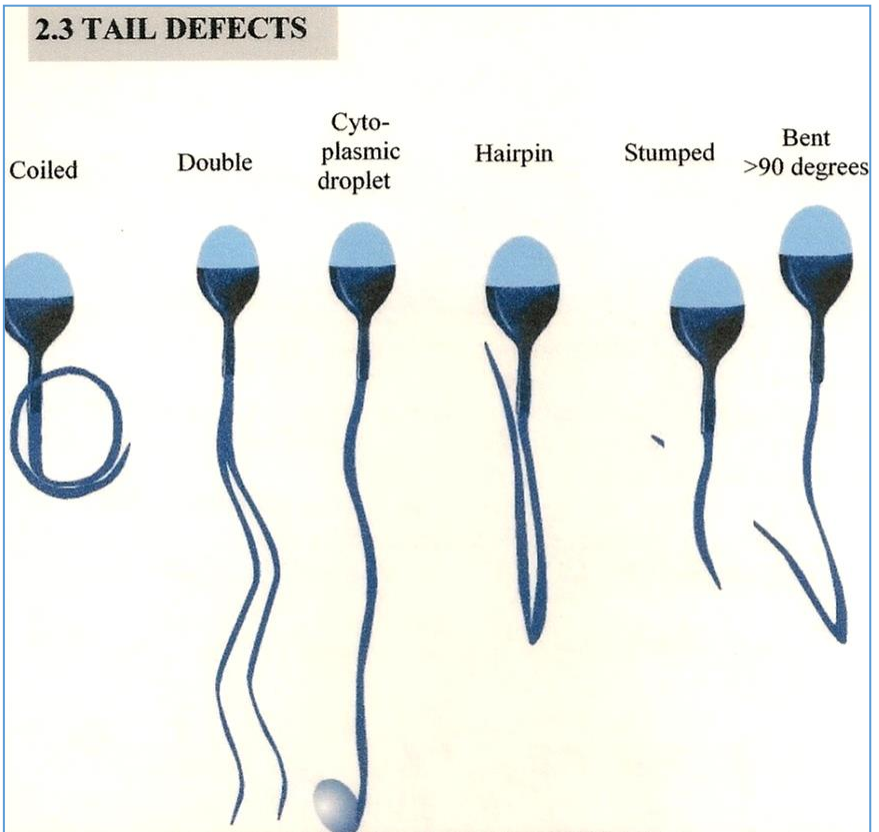
Espermatozoides Sanos

Anexo 6



Espermatozoides defectos de Cabeza (A) y Coello (B)

Anexo 7



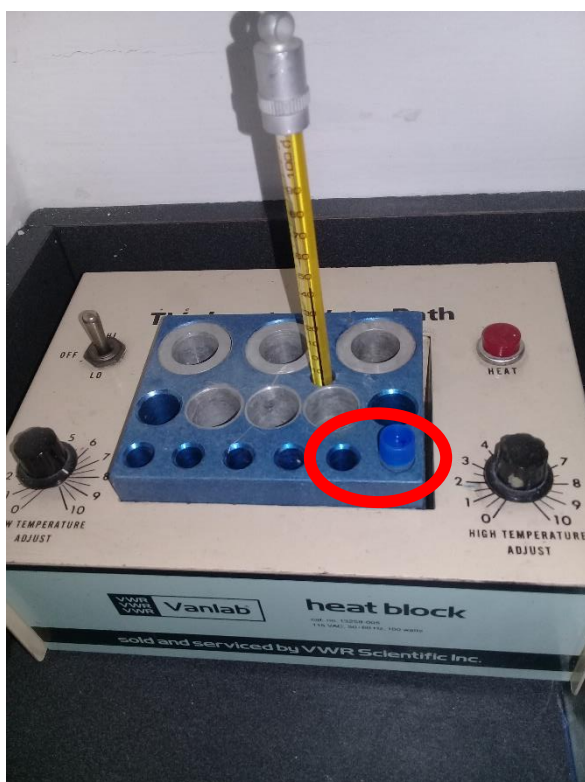
Espermatozoides con defectos en la Cola

Anexo 8



Kit de prueba del SCD

Anexo 9



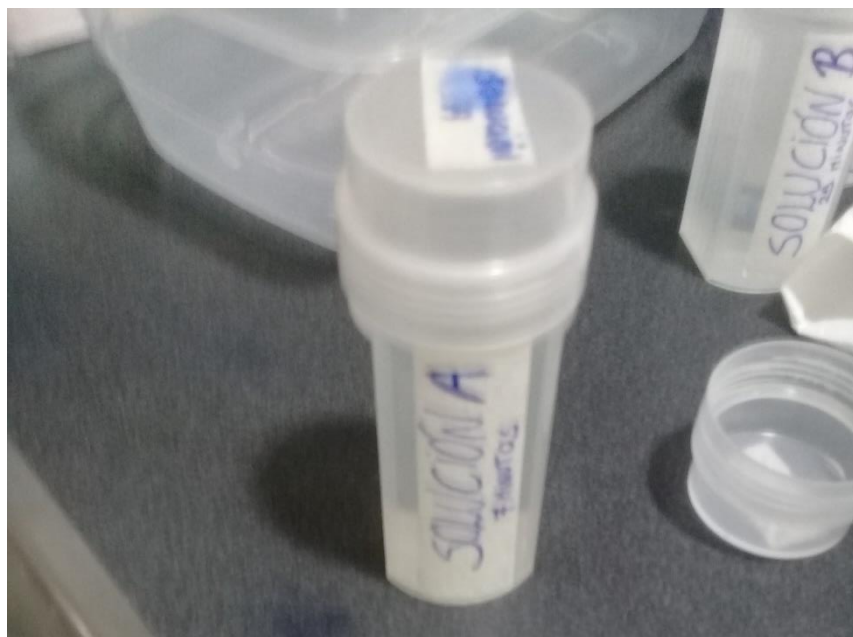
La agarosa dentro del baño en seco

Anexo 10



La agarosa en la incubadora

Anexo 11



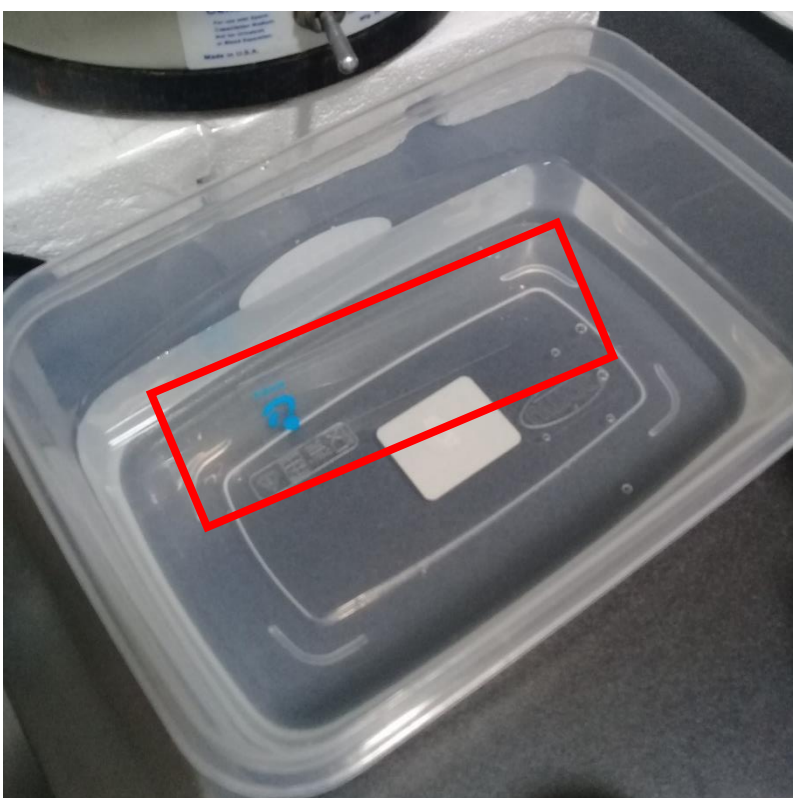
Solución A

Anexo 12



Solución B

Anexo 13



Placa en agua destilada

Anexo 14



Etanol a diferentes concentraciones

Anexo 15



Tinción de Wright's (A) y el buffer Wright's (B)

Anexo 16



Poniendo las gotas de Tinción de Wright

Anexo 17



Colocando las gotas del buffer Wright