

La calidad espermática evaluada mediante metodologías no convencionales

Sperm quality analysis by non-conventional methodologies

Jennifer Puerta-Suárez MB¹, B. José Manuel Mayorga-Torres Biol²,
Luisa Ospina-Medina MB¹, Jesús Berdugo-Gutiérrez MSc³, Walter Cardona-Maya PhD⁴.

Resumen: Existen diferentes metodologías para evaluar la calidad seminal, siendo la valoración de la movilidad y de la morfología espermática los indicadores más comúnmente utilizados, sin embargo, los espermatozoides poseen ciertas características que no siempre pueden analizarse a través del examen tradicional. En esta revisión de la literatura se describen algunas metodologías alternativas empleadas para observar y evaluar las características seminales. La movilidad, la viabilidad y la morfología espermática pueden evaluarse empleando metodologías manuales y análisis asistidos por computador. Otras características evaluables de la biología espermática son la producción de especies reactivas del oxígeno, la calidad mitocondrial y el ADN espermático. Esta revisión demuestra que existe una amplia disponibilidad de metodologías para el análisis seminal, sin embargo, cada día se siguen implementando nuevas técnicas, lo que impactará en el entendimiento de la fisiología espermática. En un futuro estas herramientas diagnósticas podrán incidir en el beneficio de los pacientes con infertilidad.

Palabras Clave: análisis de semen, movilidad espermática, viabilidad espermática, cabeza del espermatozoide, cola del espermatozoide, pieza intermedia del espermatozoide.

Abstract: There are different methodologies for assessing semen quality, assessment of mobility and sperm morphology are the most commonly used indicators. However, sperm have certain characteristics that cannot always be analyze through the traditional examination. In this review are describe some alternative methodologies to observe and assess the seminal characteristics. Motility, viability and sperm morphology can be evaluated using manual methodologies and computational analysis. Other quantifiable characteristics of sperm biology are the production of reactive oxygen species, mitochondrial and DNA sperm quality. Here is shown that there are many methodologies for seminal analysis, however, each day are going to implementing new techniques, which will impact on the understanding of sperm physiology and in the future, they may improve the diagnosis of individuals.

Keywords: semen analysis, sperm motility, sperm viability, sperm head, sperm tail, sperm midpiece.

Puerta-Suárez J, Mayorga-Torres BJM, Ospina-Medina L, Berdugo-Gutiérrez J, Cardona-Maya W. La calidad espermática evaluada mediante metodologías no convencionales. *Medicina & Laboratorio* 2014; 20: 153-168.

¹Microbióloga, Grupo Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

²Biólogo, Grupo Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³Médico Veterinario, MSc en Genética humana, Grupo Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁴Bacteriólogo, MSc en Ciencias Básicas Biomédicas, PhD en Biología. Grupo Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Calle 52 # 61-30, Laboratorio 534. Teléfono: 2196476, e-mail: wdcmaya@gmail.com.

Conflicto de intereses: los autores declaran que no tiene conflicto de intereses.

Medicina & Laboratorio 2014; 20: 153-168

Módulo 27 (Salud Sexual y Reproductiva), número 4. Editora Médica Colombiana S.A. 2014©

Recibido el 12 de marzo de 2014; aceptado el 28 de abril de 2014

El éxito reproductivo está determinado por una serie de factores entre los que se incluyen la calidad de los gametos masculinos y femeninos, siendo el primero el objeto de interés de esta revisión. El espermatozoide realiza un largo y aparatoso viaje en búsqueda de su homólogo femenino, sin embargo, éste no va sólo, lo acompañan una gran cantidad de componentes que forman el vehículo a través del cual esta célula se desplaza; a este conjunto se le denomina semen, el cual es motivo de análisis tanto en laboratorios clínicos como de investigación empleando un elevado número de pruebas [1]. En la actualidad existen diferentes metodologías para evaluar la calidad seminal, siendo la valoración de la movilidad y de la morfología espermática los indicadores comúnmente utilizados en el análisis seminal [2]; en la figura 1 se enumeran algunas de éstas metodologías. El espermograma es un examen que brinda una aproximación de la capacidad reproductiva del hombre, en el que se tienen en cuenta las propiedades macro y microscópicas del eyaculado [1], sin embargo, no es suficiente con describir las particularidades físicas de los espermatozoides para determinar el éxito reproductivo de un individuo, debido a que éstos poseen ciertas características que no siempre pueden analizarse a través del examen tradicional [3]. Por lo tanto, la implementación de metodologías alternativas que tengan en cuenta propiedades particulares de las células espermáticas, ha permitido ampliar el conocimiento de la biología del espermatozoide y proponer sistemas de evaluación de gran utilidad clínica, de forma ágil, directa, más económica e imparcial [3-11].

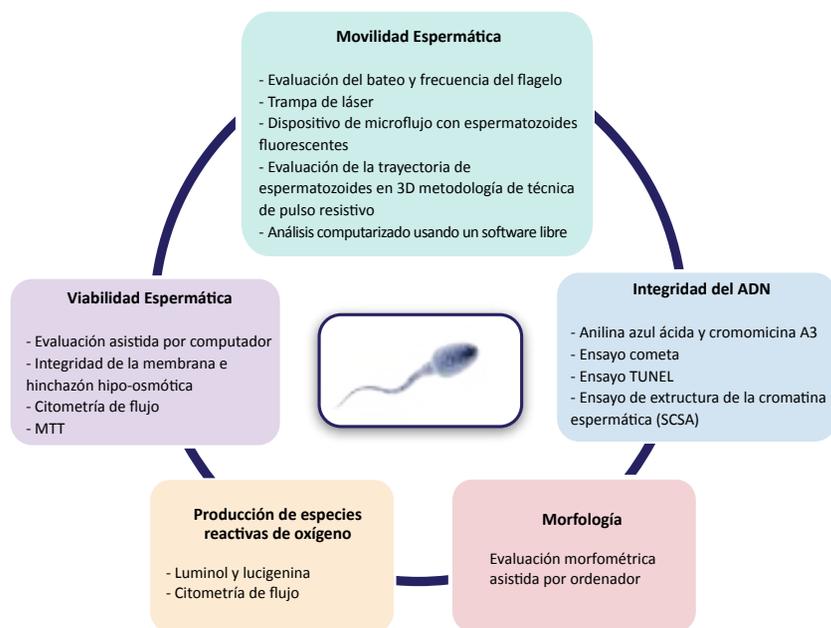


Figura 1. La calidad espermática evaluada mediante metodologías no convencionales.

Durante los últimos 60 años, la comunidad científica ha trabajado sobre los parámetros seminales tanto convencionales [12, 13] como funcionales [3, 14], con el fin de entender el rol que éstos desempeñan en la fertilidad, sin embargo, muchas de estas técnicas son aún desconocidas por quienes realizan la evaluación del semen, por lo que el objetivo de esta revisión es describir algunas de estas metodologías alternativas para observar y evaluar las características espermáticas.

Movilidad espermática

Los espermatozoides son células altamente especializadas que poseen propiedades únicas [15], entre las que se resalta la capacidad de desplazarse mediante un movimiento flagelar, una particularidad esencial en la reproducción natural. Para llegar a la ampulla (el sitio de la fecundación) los espermatozoides deben recorrer un largo trayecto a través del tracto reproductivo femenino en el que se preparan para interactuar con el oocito mediante un proceso conocido como capacitación espermática [16]. La movilidad es uno de los parámetros seminales más importantes durante la evaluación del semen y diversas metodologías han sido usadas, entre las que se incluyen la determinación manual realizada por un observador entrenado usando microscopía de luz [1], la computarizada mediante el sistema automático de análisis de espermatozoides, la cual utiliza una cámara digital y un programa informático para la determinación de la movilidad y las características de desplazamiento [17], además del uso de otros métodos como: *i)* evaluación del bateo y frecuencia del flagelo mediante el destello de luz [18]; *ii)* trampa de láser óptica [19, 20]; *iii)* dispositivo de microflujo con espermatozoides fluorescentes [21]; *iv)* evaluación de la trayectoria de espermatozoides en 3D [22, 23]; *v)* metodología de técnica de pulso resistivo [24]; y *vi)* análisis computarizado usando un software libre [25], que se describen a continuación.

Evaluación del bateo y frecuencia del flagelo

Esta técnica mide la frecuencia de batido flagelar espermático utilizando un sincronizador de la frecuencia del destello de la luz, conformado por un microscopio invertido donde se coloca la muestra, un iluminador acoplado al sistema de luz del microscopio, un generador de señales, un generador de impulsos (que procesa la señal), un dispositivo de conteo de la señal (donde se muestra el cambio de la frecuencia del generador de impulsos), entre otros accesorios. El iluminador libera pulsos cortos de luz visible al recibir los impulsos eléctricos emitidos por un generador y la frecuencia de la luz es calculada por la acumulación de señales en el dispositivo de conteo. Para la sincronización de la frecuencia se observan diferentes patrones de ritmo de la cola de los espermatozoides, se selecciona un espermatozoide normal y su movimiento es sincronizado bajo la luz del iluminador y cuantificado como la variación de la frecuencia; de esta manera, si los espermatozoides presentan un incremento en el bateo de la cola el destello de la luz se irá incrementado [18]. En un estudio de Chen y colaboradores, los espermatozoides puros de 40 hombres se incubaron con pentoxifilina, un tratamiento utilizado para activar el movimiento espermático, y observaron un incremento en la frecuencia del bateo de la cola respecto al mayor nivel de los espermatozoides no tratados, datos que se correlacionaron con los resultados obtenidos al analizar las mismas muestras mediante el sistema automático de análisis de espermatozoides [18].

Trampa de láser

Nascimento y colaboradores describen el uso de una trampa de láser óptica para calcular la movilidad espermática mediante la medición de la fuerza de movimiento (o fuerza de nado) de los espermatozoides. El sistema está conformado por un microscopio y un haz de luz de láser que representa la trampa óptica y es proyectado hacia la muestra de semen. La muestra se mueve en la platina del microscopio para ubicar la cabeza del espermatozoide en la trampa

de láser (dentro del haz de luz) donde queda atrapado dado a que su tamaño es menor a la longitud de onda del haz del láser. La potencia del láser sobre la muestra va disminuyendo a una velocidad controlada hasta que el espermatozoide escapa de la trampa de láser; de esta manera, la mínima cantidad de potencia del láser necesaria para mantener el espermatozoide en la trampa (o el umbral de potencia a la que escapa de ella) es directamente proporcional a la fuerza de movimiento [19, 20]. Esta metodología fue utilizada en muestras de semen provenientes de humanos y de perros domésticos en las que se calculó la trayectoria de los espermatozoides con la información generada por el láser y se analizaron en un software integrado al sistema, encontrando que los espermatozoides humanos tenían una baja variabilidad; además, demostraron que el láser no afecta la calidad seminal en función del tiempo de la medición [19].

Dispositivo de microflujo con espermatozoides fluorescentes

La cantidad de espermatozoides móviles y la concentración espermática puede ser evaluada usando un dispositivo de microflujo, que incluye una cámara para la muestra, una microcubeta de detección, una línea de microflujo que une ambas partes y el marcaje de los espermatozoides con una sonda fluorescente. Una vez la muestra es depositada en la cámara correspondiente, los espermatozoides móviles marcados cruzan la interfase de la línea de microflujo hasta la microcubeta de detección, donde son excitados por la luz de excitación y la señal de emisión es detectada y cuantificada por un microfluorómetro. La intensidad de fluorescencia se correlaciona con la concentración de espermatozoides móviles en la muestra de semen, con resultados comparables al sistema automático de análisis de espermatozoides [21].

Evaluación de la trayectoria de espermatozoides en 3D

Esta metodología publicada por Su y colaboradores puede ser ampliamente distribuida en las clínicas y centros de fertilidad para la cuantificación de la movilidad espermática. Se trata de una plataforma computacional de imágenes holográficas libre de lentes, que utiliza luz emitida por dos diodos emisores de luz (LED) de diferente longitud de onda, los cuales iluminan simultáneamente en dos ángulos diferentes (rojo a 0°, azul a 45°) a los espermatozoides que se encuentran depositados en un chip semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS), que registra los hologramas que codifican la información de la posición de cada espermatozoide. Este método permite determinar cuatro tipos de movi­lidades: movimiento típico (mayor al 90% de los espermatozoides) (Sakkas, 1995 #32), helicoidal (de 4% a 5% de los espermatozoides), hiperactivado (menor al 3% de los espermatozoides) e hiperhelicoidal (menor al 0,5% de los espermatozoides). Dentro de los hallazgos del estudio los autores observaron una tendencia de los espermatozoides humanos con movimiento helicoidal a hacer las hélices hacia el lado derecho (aproximadamente el 90%), información que puede tener una implicación clínica y biológica de gran importancia [22].

Metodología de técnica de pulso resistivo

Algunas propiedades de la movilidad pueden ser evaluadas por la técnica de pulso resistivo que está basada en el principio de impedancia eléctrica y utiliza un dispositivo microfluídico

que comprende tres canales con una abertura en la intersección. Los espermatozoides son depositados en el tanque B y se aplica un campo de flujo hidrostático para que viajen hacia la abertura que detecta los cambios en el voltaje inducidos por cada célula, lo que permite calcular la trayectoria y velocidad de cada espermatozoide. Este ensayo logra demostrar que esta metodología puede ser una alternativa más económica para evaluar la movilidad y el bateo de cola espermático que el sistema automático de análisis de espermatozoides [24].

Análisis computarizado usando un software libre

La evaluación de las características de la movilidad espermática puede ser analizada mediante el programa de descarga libre *Image J* (Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos), empleando el complemento "Manual Tracking". Por medio de este programa se logra determinar la velocidad espermática promedio ($\mu\text{m}/\text{seg}$), la velocidad espermática lineal progresiva ($\mu\text{m}/\text{seg}$) y la linealidad media (velocidad espermática lineal progresiva/velocidad espermática promedio), tras realizar un vídeo en un microscopio de luz, cargarlo en el programa y crear una cuadrícula de análisis de 12 campos. Los resultados obtenidos por este sistema muestran una alta correlación con los de un observador experto usando el procedimiento para la evaluación de la movilidad propuesto por la Organización Mundial de la Salud [26].

Viabilidad espermática

Tradicionalmente éste parámetro es evaluado mediante el uso de tinciones vitales, en las que el paso del colorante a través de la membrana es un indicativo de la pérdida de integridad y funcionalidad que se pierde cuando la célula inicia su proceso de muerte. Los colorantes más usados para evaluar este parámetro son la eosina "Y" y la nigrosina [1]. La viabilidad espermática adquiere gran importancia en aquellas muestras de semen donde se observa menos del 40% de células móviles [1]. Generalmente es evaluada de forma manual por personal entrenado, no obstante, presenta un alto grado de variabilidad debido a la subjetividad producida por las diferencias intra e inter individuo y la fatiga ocular del experto [10]. Como métodos alternativos para la evaluación de la viabilidad espermática se han propuesto los que se describen a continuación.

Evaluación asistida por computador

Los sistemas comerciales de análisis asistido por computador ofrecen alta precisión, reproducibilidad, fiabilidad y rapidez en los análisis [27], sin embargo, presentan un alto costo, lo que limita su incursión en el mercado. Otros programas de menor precio emplean el análisis de imágenes obtenidas con cámara digital de alta resolución acoplada a un microscopio de luz, a partir de muestras seminales previamente marcadas con colorantes vitales de las cuales se seleccionan regiones de espermatozoides vivos y muertos. Posteriormente, se aplica la técnica estadística de análisis discriminante de Fisher para separar las regiones de interés con base en los componentes de color RGB de cada píxel en cada imagen, seguido de la clasificación de los espermatozoides como vivo o muerto a través del análisis estadístico de agrupamiento y particularmente la técnica de K-medias [10]. Roa-Guerrero y colaboradores analizaron la viabilidad espermática utilizando 110 imágenes de muestras de semen marcadas con eosina "Y" provenientes de 14 individuos y demostraron una exactitud de 87,9% en la identificación de

los espermatozoides vivos y los espermatozoides muertos, 93,4% de efectividad para detectar los vivos y 76% de efectividad para detectar los muertos, al comparar esta evaluación con la realizada manualmente empleando un microscopio convencional [10].

Integridad de la membrana e hinchazón hipo-osmótica

El principal objetivo de esta técnica es evaluar la funcionalidad de la membrana del espermatozoide. El fundamento en el que se basa es la regulación del potencial electroquímico entre el medio interno y externo de las células en condiciones normales, en el que las células vivas al exponerse a ambientes hipo-osmóticos permiten el paso de agua hacia su interior causando que se hinchen, lo que no ocurre en las células con las membranas afectadas o muertas. Para esta evaluación las células son expuestas a soluciones hipo-osmóticas que contienen bajas concentraciones de fructosa (75 mM) y de citrato de sodio (25 mM) en un intervalo de tiempo de 30-60 minutos, seguido de la observación de la reacción en microscopio de luz. Al comparar esta técnica para la determinación de la viabilidad espermática con la tinción con dos colorantes vitales, se encontró que la evaluación del enrollamiento de la cola como una medida de viabilidad muestra una sensibilidad del 30% y una especificidad del 100% [4], mientras otros autores reportan una sensibilidad del 99% y una especificidad del 83% [6]. Además, se ha propuesto que el número de falsos positivos tiende a aumentar debido a incubaciones prolongadas que pueden generar daños sobre la membrana de los espermatozoides [6, 28].

Análisis de viabilidad por citometría de flujo

El principio de la técnica consiste en el marcaje y cuantificación de las células utilizando una sonda o anticuerpo que se une a la célula y que al ser excitado con un láser de luz, es capaz de emitir una fluorescencia que es detectada en un fotomultiplicador en un citómetro de flujo [29]. La implementación del análisis seminal mediante citometría de flujo presenta una serie de ventajas dentro de las que se destacan: la evaluación multi-paramétrica, el mayor número de células evaluadas y la rapidez y objetividad de los resultados [30]. Para la evaluación de la viabilidad espermática se emplean marcajes que se basan en la capacidad que tienen las células vivas de excluir o no el colorante [31], entre los cuales encontramos el doble marcaje SYBR-14/yoduro de propidio. El SYBR-14 es un colorante de ácidos nucleicos, permeable a la membrana y que marca los espermatozoides vivos (con membranas celulares intactas) con fluorescencia verde. El yoduro de propidio es un colorante de ácidos nucleicos, impermeable a la membrana y que marca con una fluorescencia roja a aquellos espermatozoides que hayan perdido la integridad de su membrana plasmática [5, 30]. Otros ejemplos son: el yoduro YO-PRO®-1, un marcador verde fluorescente impermeable a la membrana, que ingresa en las células apoptóticas marcándolas (a diferencia del yoduro de propidio) sin teñir las células vivas; y el Hoechst, el cual es usado como contra-tinción nuclear, es permeable a la membrana y emite una fluorescencia azul cuando se une al ADN de las células vivas [30].

Ensayo colorimétrico con sales de tetrazolio

El ensayo de MTT permite evaluar la viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico y lectura por espectrofotometría, utilizando una sal de tetrazolio como el MTT (bromuro de 3 [4,5-dimetiltiazol-2-y1] -2,5-difeniltetrazolio), o algunas moléculas similares como MTS

(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) y WST1 (di-sulfonato 4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)- 2H- 5 -tetrazolio]- 1,3-benzeno) [32] altamente solubles en agua, las cuales producto de la escisión del anillo de tetrazolio por el sistema succinato deshidrogenasa mitocondrial, son reducidas a formazán produciendo una coloración púrpura. De esta manera, la cantidad de formazán formado permite estimar la cantidad de mitocondrias y la capacidad metabólica de las mismas que será equivalente al número de células vivas en la muestra [33]. La viabilidad se puede analizar cada 30 minutos entre una y cuatro horas después de adicionar el MTT, siendo el tiempo óptimo reportado para realizar la valoración dos horas [32-34]. En un estudio realizado por Nasr-Esfahani y colaboradores, usando 57 muestras de semen y realizando la evaluación de la viabilidad empleando el test de HOST, dos colorantes vitales (eosina y nigrosina) y este ensayo, encontraron una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100% con el empleo del MTT [6].

Morfología espermática

La morfología es un criterio de evaluación espermática ampliamente utilizado en el que se analizan las características morfométricas de la cabeza, pieza media y cola del espermatozoide bajo criterios estrictamente establecidos, no obstante, es un parámetro difícil de analizar debido a la subjetividad del mismo. La recuperación de espermatozoides del moco cervical luego del coito y de la zona pelúcida ha contribuido a definir la morfología considerada como normal o ideal [1]. En comparación con otras especies animales los espermatozoides humanos presentan una amplia variabilidad morfológica, lo cual algunos autores han propuesto que puede deberse a una baja eficiencia en el proceso espermatogénico [35]. La morfología es un criterio importante y cobra relevancia durante los procesos de reproducción asistida, en los que se prioriza la selección espermática en términos de movilidad y morfología [2]. Para la evaluación de este parámetro se realizan extendidos con coloraciones como la de Papanicolaou o Diff-Quik, con las cuales se observa al microscopio de luz la cabeza de color azul pálido en la región acrosomal y azul oscuro en la región post-acrosomal, la pieza intermedia puede mostrar algunas manchas de color rojo y la cola está teñida de color azul o rojizo. Además, existen métodos comerciales de tinción rápida en los que una gota de semen se deposita en una lámina que contiene una sustancia fijadora y los colorantes, sin embargo, no son recomendados debido a que en ocasiones no proporcionan una distribución uniforme de la muestra, lo que dificulta la visualización para la clasificación morfológica [1].

Evaluación morfométrica asistida por ordenador

El sistema automático de análisis de morfología espermática permite clasificar la cabeza y la pieza intermedia como normal o anormal, dependiendo de las dimensiones y de la forma para cada atributo; además, tiene en cuenta la proporción de la región acrosomal respecto al núcleo del espermatozoide. La precisión y reproducibilidad puede ser menor del 7%, lo cual es mucho mayor comparado con la evaluación manual realizada por un experto. A pesar de las evidencias reportadas sobre la relación de los resultados obtenidos a través de esta metodología y la fertilidad masculina, en las que se ha encontrado que los hombres infértiles tienen porcentajes aumentados de espermatozoides morfológicamente anormales comparados con hombres fértiles [36], se requieren estudios poblacionales más extensos que permitan mejorar

las características morfológicas a tener en cuenta en el espermatozoide para refinar la aplicación de este método [1].

Producción de especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno son productos del metabolismo del oxígeno molecular entre los que se incluyen el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilo e hidropéroxilo y el óxido nítrico, los cuales en la muestra seminal pueden ser producidas tanto por leucocitos como por los espermatozoides [1] y cuya producción puede ser medida o cuantificada mediante distintas técnicas de laboratorio como un parámetro de la calidad espermática [11]. Aunque a bajas concentraciones las especies reactivas de oxígeno participan en varios eventos de señalización en el espermatozoide como la quimiotaxis, la adhesión a la zona pelúcida de los oocitos, la reacción acrosomal, entre otros, un aumento en la producción de las mismas podría estar relacionado con problemas de fertilidad [37]. Alteraciones sobre la morfología espermática están altamente correlacionadas con el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, en especial asociadas al exceso de residuos citoplasmáticos en la pieza media [38]. Existen varias aproximaciones metodológicas para analizar la producción celular de especies reactivas de oxígeno en el semen como un parámetro de la calidad espermática. Dichas pruebas deben ser muy sensibles ya que en condiciones normales la concentración de especies reactivas de oxígeno en el semen debe ser baja si existe un balance oxidoreductor adecuado [1, 7, 11, 38-40].

Pruebas de quimioluminiscencia: luminol y lucigenina

Una de las pruebas más utilizadas es la quimioluminiscencia, la cual utiliza sondas como el luminol (3-aminoftalhidrazida) o lucigenina (bis-N-metilacridinio nitrato) [1], que gracias a la reacción química con las especies reactivas de oxígeno dan como producto final una molécula oxidada capaz de emitir luz, la cual es medida por un luminómetro y cuyos resultados son expresados en unidades relativas de luminiscencia (RLU) o fotones contados por minuto (cpm) [7]. El luminol es permeable a la membrana y es oxidado producto de la reacción con las especies reactivas de oxígeno principalmente anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, tanto intra como extracelulares [7, 37], sin embargo, debido a que el eyaculado es una mezcla heterogénea, contiene diferentes linajes celulares y secreciones no directamente relacionadas con los espermatozoides que pueden modificar las señales quimioluminiscentes generadas [41].

Por su parte, la lucigenina al tener una carga iónica positiva y no ser permeable permite detectar especies reactivas de oxígeno de tipo extracelular tales como el anión superóxido y el radical hidroxilo [41]. En el contexto del espermatozoide, ha sido utilizado para la detección de especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial en suspensión de espermatozoides de ratas obtenidos de epidídimo [42]. McKinney y colaboradores analizaron las muestras de semen de 47 hombres y compararon los niveles de detección de especies reactivas de oxígeno empleando luminol y luciferina tras el estímulo con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), encontrando que el 43% de las muestras producían niveles detectables de especies reactivas de oxígeno con señales de luminiscencia similares con ambas sondas [43].

Pruebas por citometría de flujo

La evaluación de la producción de las especies reactivas de oxígeno en muestras espermáticas puede realizarse mediante citometría de flujo utilizando los colorantes 2'7' diclorofluoresceína diacetato y dihidroetidio, los cuales permiten cuantificar los niveles de peróxido de hidrógeno y anión superóxido, respectivamente [39]. La 2'7' diclorofluoresceína diacetato es una molécula permeable y no fluorescente, que al ingresar a la célula es desesterificada por las esterasas celulares volviéndola impermeable y es oxidada por las especies reactivas de oxígeno produciendo 2'7' diclorofluoresceína que es altamente fluorescente [44]. El dihidroetidio es un compuesto permeable que al reaccionar con el anión superóxido intracelular forma el 2-hidroxietidio, un producto rojo fluorescente que se intercala en el ADN [45]. En un estudio de Mahfouz y colaboradores se empleó la citometría de flujo para evaluar los niveles de peróxido de hidrógeno y anión superóxido, hallando en fracciones de espermatozoides inmaduros niveles significativamente más altos de especies reactivas de oxígeno en comparación con la fracción de espermatozoides maduros [39].

Integridad del ADN

La importancia de la compactación del ADN espermático en la protección de la información genética masculina frente a diferentes factores internos y externos ha sido claramente demostrada [46-49]. Los daños en el ADN de espermatozoides maduros pueden ocurrir a nivel testicular, epididimal o post-eyaculatorio [50], cuyas causas pueden estar relacionadas con fallas en el empaquetamiento, en la madurez nuclear, en la fragmentación de la cromatina o por defectos en la integridad del ADN, además de aneuploidías [51]. En la actualidad se han implementado diversas metodologías capaces de detectar daños sobre la impronta genética paterna, cada una de estas evaluando diferentes parámetros relacionados con alteraciones del ADN espermático. Entre estas pruebas encontramos los ensayos cometa (electroforesis de células individuales) y TUNEL (del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling*) como las metodologías más utilizadas [8].

Si bien algunos quiebres en el ADN son necesarios para reducir el estrés torsional experimentado por la doble hélice cuando ocurren reordenamientos en la transición de las histonas a las protaminas en las espermátidas [52-54], si estos quiebres temporales no son reparados antes de completar la espermatogénesis podrían tener efectos deletéreos, teniendo en cuenta que el espermatozoide maduro no posee mecanismos significativos de reparación del ADN [55]. A continuación se describen algunas metodologías para la evaluación de la integridad del ADN.

Anilina azul ácida y cromomicina A3

Las coloraciones con anilina azul ácida y cromomicina A3 permiten evaluar la madurez nuclear espermática de acuerdo a la composición de las proteínas encargadas del empaquetamiento nuclear. La coloración con anilina azul ácida permite determinar la densidad del empaquetamiento discriminando entre las histonas ricas en lisina y las protaminas ricas en arginina y cisteína, de esta manera los núcleos ricos en histonas en los espermatozoides inmaduros reaccionan de manera positiva adquiriendo una coloración azul, mientras que los núcleos ricos en protaminas en los espermatozoides maduros reaccionan negativamente y

no se tiñen. El porcentaje de espermatozoides que se tiñen con azul de anilina se determina contando 200 espermatozoides por portaobjeto bajo microscopía de luz [8]. Datos previos han demostrado que una eyaculación normal debe contener al menos 75% de espermatozoides sin teñir, lo que indica una maduración nuclear normal de los espermatozoides eyaculados, a su vez, los resultados positivos para esta prueba han sido indicativos de una asociación fuerte entre la cromatina espermática anormal y la infertilidad [56].

La cromomicina A3 es un fluorocromo específico de guanina/citosina que ha sido empleado para evaluar el grado de protaminación y es indicativo de que tan mal empaquetada está la cromatina de los espermatozoides. La cromomicina A3 y las protaminas compiten por los mismos sitios de unión al ADN, de esta manera, una alta fluorescencia es un indicador de un bajo estado de protaminación. La determinación de la fluorescencia se realiza por microscopía de fluorescencia en 200 espermatozoides seleccionados aleatoriamente por cada placa, discriminando los espermatozoides que se tiñen de color amarillo brillante como cromomicina A3 positivos y los marcados de color amarillo opaco cromomicina A3 negativos. Este marcaje ha demostrado ser un buen discriminador de éxito o fracaso de una fertilización *in vitro* con una sensibilidad del 73% y una especificidad del 75%; en casos de inyección intracitoplasmática de espermatozoides, a pesar de no ser indicativo de fracaso de la fertilización, las muestras de semen con más del 30% de espermatozoides positivos pueden tener menores tasas de fertilización [8].

Ensayo cometa

El ensayo cometa o ensayo de electroforesis de células individuales permite evaluar el daño en el ADN en cada espermatozoide por medio de la migración electroforética en microgeles de agarosa que se encuentran en placas portaobjetos, en las cuales los espermatozoides son depositados y lisados para eliminar proteínas asociadas al ADN y obtener el material genético de las células individualizadas en forma laxa [8, 57]. La electroforesis se realiza en un medio neutro o alcalino, lo que permite la migración de ADN con quiebres de cadena doble o de cadena doble y sencilla, respectivamente, desde el núcleo hacia el ánodo; seguido del marcaje de las placas con un agente intercalante del ADN, generalmente SYBR Green I, y la visualización usando microscopía de fluorescencia. Si la célula ha sido dañada y su ADN fragmentado se observa una cola desde el núcleo ("cabeza") dando la apariencia de un cometa cuya extensión (tamaño, longitud, densidad) de la cola es proporcional al daño en la integridad del mismo [8]. Este ensayo es una prueba económica, con un bajo coeficiente de variación intra-ensayo y ha sido de utilidad en evaluación del daño del ADN después de la crioconservación de muestras de semen, al igual que en la predicción del desarrollo embrionario después de la fecundación *in vitro* y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en parejas con infertilidad inexplicada [8]. Singh y colaboradores, al estudiar la relación entre la edad, el daño en el ADN y los niveles de apoptosis en los espermatozoides humanos, demostraron que al avanzar la edad se incrementaba el daño en el ADN de los espermatozoides, pero se observaba menor porcentaje de espermatozoides apoptóticos [58].

Ensayo TUNEL

El ensayo TUNEL se fundamenta en la cuantificación de nucleótidos marcados con 2'-desoxiuridina, 5'-trifosfato (dUTP), que son incorporados en el extremo 3'-OH en rupturas del

ADN de una o de doble cadena por actividad de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) [8, 59]. Debido a que los espermatozoides no poseen un sistema de reparación de su material genético [8], la incorporación de nucleótidos marcados producto de la acción enzimática es la señal del grado de fragmentación del ADN de las células germinales, en donde entre mayor es la frecuencia de la señal fluorescente, mayor es el daño sobre el ADN. La cuantificación de la señal puede hacerse mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia, en esta última, los espermatozoides con ADN normal tienen únicamente el fondo de la tinción fluorescente, mientras que aquellos con ADN fragmentado tienen una fluorescencia brillante.

La técnica del TUNEL ha demostrado ser potencialmente útil como predictor de la tasa de embarazo por inseminación intrauterina, tasa de división embrionaria por fertilidad *in vitro* y la tasa de fertilización por inyección intracitoplasmática de espermatozoides; además, proporciona una explicación para la pérdida recurrente del embarazo [8]. En un estudio de Sakkas y colaboradores en el que evaluaron la relación entre el daño en el ADN, medida por el ensayo de TUNEL, y marcadores de apoptosis como Fas, Bcl-x y p53 en espermatozoides humanos de hombres con parámetros seminales normales y anormales, encontraron que las muestras de semen con baja concentración espermática y morfología alterada tenían una mayor probabilidad de presentar una prueba de TUNEL positiva y expresar Fas y p53, así mismo, proponen que la presencia de daño en el ADN implica un proceso de apoptosis que puede estar relacionado con problemas en el proceso de remodelación nuclear [60].

Ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA)

Este ensayo se basa en la mayor susceptibilidad a la desnaturalización ácida inducida *in situ* de la cromatina espermática anormal, haciendo uso de las propiedades fotoquímicas del colorante naranja de acridina que emite fluorescencia en dos longitudes de onda diferentes de acuerdo a si se encuentra intercalado en ADN nativo o de cadena doble (fluorescencia verde) o en ADN desnaturalizado o de cadena sencilla (fluorescencia roja). Para esto, los espermatozoides son sometidos a un tratamiento con una solución detergente ácida, son coloreados con naranja de acridina y el grado de desnaturalización de su ADN es determinado por medición de la fluorescencia por citometría de flujo, seguido del cálculo de la relación entre la fluorescencia media emitida en rojo respecto a la fluorescencia media total (roja + verde) [8, 61].

Esta evaluación ha sido ampliamente usada en estudios como indicador de calidad espermática asociada principalmente a problemas de fertilidad [9, 40, 47, 61, 62] y ha sido considerado el mejor ensayo en la predicción de los distintos resultados de las técnicas de reproducción asistida incluyendo las tasas de fertilización y de implantación [8]. A pesar de la relación que se ha demostrado con el uso de estas técnicas entre las anomalías de la cromatina y el daño del ADN en el espermatozoide humano con la infertilidad, aún no es claro cómo se generan las alteraciones. Entre los mecanismos posiblemente relacionados se han propuesto fundamentalmente cuatro: empaquetamiento defectuoso de la cromatina espermática, apoptosis, estrés oxidativo y lesiones genéticas [63-65].

Discusión y conclusiones

Un hecho natural en el proceso de generar conocimiento es la posibilidad de cambio, especialmente en la concepción y aplicación de sistemas diagnósticos. En infertilidad, un examen que ha generado controversia a través de los años es el análisis seminal. Es inevitable que tenga que analizarse el semen como único medio de observación de los espermatozoides y que de la descripción detallada de sus características cuali y cuantificables se estime el potencial fértil de un hombre, sin embargo, es precisamente ahí donde se genera la controversia, en la necesidad de establecer con claridad límites entre la normalidad y la anormalidad. Esta gran dificultad llevó a la Organización Mundial de la Salud a proponer valores de referencia para el espermograma [1, 66], pero sobre todo a estandarizar la metodología para su realización basado en la observación directa de las células. Desde 1970 existía la inquietud de aplicar métodos que disminuyeran la subjetividad de la observación humana y permitieran obtener una mayor cantidad de información de las células, especialmente desde el punto de vista cuantitativo [67]. Hoy en día es un hecho que para determinar la movilidad, la concentración y la morfología se puede cambiar la observación directa por el uso de sistemas computarizados de imágenes [27].

Actualmente, existen diferentes metodologías aplicables al análisis seminal cuyo uso dependerá de los requerimientos y capacidad técnica del analista, así como de la disponibilidad de equipos y reactivos, sin embargo, la evaluación manual del espermograma ya no es la única herramienta con la que se cuenta para el análisis de la célula espermática. Su movilidad puede ser evaluada por técnicas que involucran desde microscopios ópticos convencionales hasta láser y equipos de evaluación computarizada, así mismo, la viabilidad, la morfología y los demás parámetros tradicionalmente evaluados por la Organización Mundial de la Salud, han sido complementados por parámetros no convencionales como los descritos en esta revisión, que permiten conocer con mayor detalle la fisiología espermática e interpretar los mecanismos por los cuales el éxito reproductivo se ve afectado.

En el desarrollo del conocimiento de la biología reproductiva se han estudiado los cambios que sufre el espermatozoide para poder fertilizar y se ha dado inicio a una carrera por cuantificar esos eventos, inicialmente describiéndolos y soñando con el establecimiento de parámetros, llegando finalmente al concepto de evaluación funcional. Para estos nuevos parámetros fisiológicos el cambio de la observación directa a la sistematización se dio gracias a técnicas con exactitud estadística y reproducibilidad para ser aplicada en andrología [68, 69]. Sin embargo, no todo está escrito, cada día se siguen implementando, mejorando o evaluando metodologías de apoyo al análisis seminal que nos permiten un mejor acercamiento al entendimiento de la fisiología espermática; cada uno de estos avances nos permitirá en un futuro diagnosticar y tratar aquellos eventos adversos que disminuyen el potencial fértil de los individuos. Finalmente se concluye que aunque existe una amplia disponibilidad de metodologías para el análisis seminal, éstas deben estar en constante evaluación para permitir sobrellevar la búsqueda de los vacíos en el conocimiento en cuanto a andrología se refiere y brindar diagnósticos clínicos más eficaces que impacten en la salud de los individuos que lo requieren [11].

Agradecimientos

A la Estrategia de Sostenibilidad 2013-2014 de la Universidad de Antioquia. A las convocatorias 566 de 2012 y 617 de 2013 por las Jóvenes Investigadoras de Colciencias Jenniffer Puerta Suarez y Luisa Ospina Medina.

Bibliografía

1. **World Health Organization.** 2010. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Fifth Edition.
2. **Abu Hassan Abu D, Franken DR, Hoffman B, Henkel R.** Accurate sperm morphology assessment predicts sperm function. *Andrologia* 2012; 44 Suppl 1: 571-577.
3. **Cardona Maya WD, Berdugo Gutierrez JA, de los Rios J, Cadavid Jaramillo AP.** Functional evaluation of sperm in Colombian fertile men. *Arch Esp Urol* 2007; 60: 827-831.
4. **Smikle CB, Turek PJ.** Hypo-osmotic swelling can accurately assess the viability of nonmotile sperm. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 200-203.
5. **Molecular Probes Inc.** LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit Eugene, Oregon, USA: Molecular Probes, Inc.; 2001.
6. **Nasr-Esfahani MH, Aboutorabi R, Esfandiari E, Mardani M.** Sperm MTT viability assay: a new method for evaluation of human sperm viability. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 477-482.
7. **Agarwal A, Allamaneni SS, Said TM.** Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 466-468.
8. **Agarwal A, Said TM.** Sperm chromatin assessment In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, eds. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques* (ed 2da). Londres, Reino Unido: Taylor & Francis Ltd; 2005: 93-106.
9. **Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid Á.** Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2010; 94: 1465-1472.
10. **Roa Guerrero E, Cortés Mancera F, Guerrero González N, Cardona Maya W, Morantes Guzmán L.** Evaluación asistida por computador de la viabilidad espermática en humanos. *Rev Ing Biomed* 2012; 6.
11. **Mayorga-Torres BJ, Cardona-Maya W, Cadavid A, Camargo M.** Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. *Actas Urol Esp* 2013; 37: 221-227.
12. **de los Rios J, Cardona-Maya W, Berdugo JA, Correa C, Arenas A, Olivera-Angel M, et al.** Los valores espermáticos de 113 individuos con fertilidad reciente no mostraron correlación con los parámetros establecidos por la OMS. *Arch Esp Urol* 2004; 57: 147-152.
13. **Berdugo J, Andrade-Rocha F, Cardona-Maya W.** Parámetros seminales en hombres fértiles de dos poblaciones sudamericanas. *Arch Esp Urol* 2009; 62: 646-650.
14. **Rodríguez E, Gil-Villa AM, Aguirre-Acevedo DC, Cardona-Maya W, Cadavid ÁP.** Evaluación de parámetros seminales no convencionales en individuos cuyas parejas presentan muerte embrionaria temprana recurrente: en busca de un valor de referencia. *Biomédica* 2011; 31: 100-107.
15. **Cardona Maya W.** Publications about sperm during the years 1897 to 2010. *Med J Reprod Infertil* 2011; 12: 43.
16. **Cardona Maya WD, Cadavid Jaramillo AP.** Complementariedad intergametos: breve revisión. *Arch Esp Urol* 2004; 57: 1107-1112.
17. **Aulesa C, Cabrera M, Alonso R, Benítez M, Martínez M.** Evaluación del sistema automatizado Sperm Class Analyzer® (SCA) para análisis del semen. *Revdell Lab Clin* 2009; 2: 8-16.
18. **Chen CS, Chao HT, Leng CH, Pan RL, Wei YH.** Direct measurement of the tail beat frequency of human sperm by flash light syn-

- chronization. *Andrologia* 1998; 30: 49-54.
19. **Nascimento JL, Botvinick EL, Shi LZ, Durrant B, Berns MW.** Analysis of sperm motility using optical tweezers. *J Biomed Opt* 2006; 11: 044001-044001-044008.
 20. **Nascimento JM.** Analysis of sperm motility and physiology using optical tweezers. *Electrical Engineering (Photonics)*. Vol. Ph.D. San Diego, California, USA: University of California; 2008: 187.
 21. **McCormack MC, McCallum S, Behr B.** A novel microfluidic device for male subfertility screening. *J Urol* 2006; 175: 2223-2227.
 22. **Su TW, Xue L, Ozcan A.** High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 16018-16022.
 23. **Cardona-Maya W.** Words of wisdom: re: high-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *Eur Urol* 2013; 63: 768-769.
 24. **Chen YA, Chen KC, Tsai VE, Huang ZW, Hsieh JT, Wo AM.** Direct Characterization of Motion-Dependent Parameters of Sperm in a Microfluidic Device: Proof of Principle. *Clin Chem* 2013; 59: 493-501.
 25. **Cardona Maya W.** Re: High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *European Urology* 2013; 768-769
 26. **Cardona Maya W.** Análisis cuantitativo del movimiento de espermatozoides humanos aplicando un programa de uso libre, estudio-piloto. *Rev UDCA Act & Div Cient* 2013; 16: 313-317.
 27. **Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002; 57: 149-179.
 28. **Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostafa T.** Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology* 2012; 80: 822-825.
 29. **Givan AL.** Flow cytometry. *Flow Cytometry Protocols*: Springer; 2004: 1-31.
 30. **Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H.** Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl* 2011; 13: 406-419.
 31. **Cardona-Maya W, Cadavid A.** Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urol Esp* 2005; 29: 676-684.
 32. **Berridge MV, Herst PM, Tan AS.** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Bio-technol Annu Rev* 2005; 11: 127-152.
 33. **Aziz DM.** Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. *Anim Reprod Sci* 2006; 92: 1-8.
 34. **Ospina Medina L, Álvarez Gómez Á, Arango Valencia V, Cadavid Jaramillo Á, Cardona Maya W.** Actividad espermicida y citotóxica del extracto de *Sapindus saponaria* L.(jaboncillo). *Rev Cubana Plant Med* 2013; 18: 187-200.
 35. **Pitnick S, Hosken DJ, Birkhead TR.** 3 Sperm morphological diversity. *Sperm biology: an evolutionary perspective* 2008: 69.
 36. **Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002; 57: 149-179.
 37. **Kashou AH, Sharma R, Agarwal A.** Assessment of oxidative stress in sperm and semen. *Methods Mol Biol* 2013; 927: 351-361.
 38. **Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas Jr AJ, et al.** Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril* 2004; 81: 349-354.
 39. **Mahfouz R, Sharma R, Lackner J, Aziz N, Agarwal A.** Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tools in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009; 92: 819-827.
 40. **Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid Á.** Role of male factor in early recurrent embryo loss: do anti-oxidants have any effect? *Fertil Steril* 2009; 92: 565-571.
 41. **Aitken RJ, Baker MA, O'Bryan M.** Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. *J Androl* 2004; 25: 455-465.
 42. **Baker MA, Aitken RJ.** Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 67.
 43. **McKinney K, Lewis S, Thompson W.** Reactive oxygen species generation in human sperm: luminol and lucigenin chemiluminescence probes. *Syst Biol Reprod Med* 1996; 36: 119-125.
 44. **Soh N.** Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Anal Bioanal Chem* 2006; 386: 532-543.
 45. **Stowe DF, Camara AK.** Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 1373-1414.
 46. **Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP.** Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004; 81: 1289-1295.
 47. **Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE.** Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod* 2010; 25: 1594-1608.
 48. **Sakkas D, Alvarez JG.** Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; 93: 1027-1036.
 49. **Rouen A, Pyram K, Pollet-Villard X, Hyon C, Dorna M, Marques S, et al.** Simultaneous cell by cell study of both DNA fragmentation and chromosomal segregation in spermatozoa from chromosomal rearrangement carriers. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30: 383-390.
 50. **Lewis S, Aitken R.** DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005; 322: 33-41.
 51. **Perreault SD, Aitken RJ, Baker HG, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, et al.** Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Advances in Male Mediated Developmental Toxicity*: Springer; 2003: 253-268.
 52. **McPherson SM, Longo FJ.** Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 1993; 158: 122-130.
 53. **Aoki VW, Liu L, Carrell DT.** Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 2005; 20: 1298-1306.
 54. **Sakkas D, Manicardi G, Bianchi PG, Bizzaro D, Bianchi U.** Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1995; 52: 1149-1155.
 55. **Smith TB, Dun MD, Smith ND, Curry BJ, Connaughton HS, Aitken RJ.** The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *J Cell Sci* 2013; 126: 1488-1497.
 56. **Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K, et al.** The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* 1996; 11: 2468-2471.
 57. **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191.
 58. **Singh NP, Muller CH, Berger RE.** Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80: 1420-1430.
 59. **Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z.** Presence of DNA Strand Breaks and Increased Sensitivity of DNA in Situ to Denaturation in Abnormal Human Sperm Cells: Analogy to Apoptosis of So-

- matic Cells. *Exp Cell Res* 1993; 207: 202-205.
60. **Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D.** Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1061-1067.
 61. **Evenson D, Jost L, Marshall D, Zinaman M, Clegg E, Purvis K, et al.** Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039-1049.
 62. **Mayorga-Torres B, Cardona-Maya W, Caddavid A, Camargo M.** Evaluation of sperm functional parameters in normozoospermic infertile individuals. *Actas Urol Esp* 2013; 37: 221-227.
 63. **Agarwal A, Said TM.** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 331-345.
 64. **Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD.** Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1, 4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997; 56: 1020-1024.
 65. **Aziz N, Agarwal A.** Evaluation of sperm damage: beyond the World Health Organization criteria. *Fertil Steril* 2008; 90: 484-485.
 66. **Cardona Maya W.** Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud-2010. *Actas Urol Esp* 2010; 34: 577-578.
 67. **Cunningham RE.** Overview of flow cytometry and fluorescent probes for cytometry. *Methods Mol Biol* 1999; 115: 249-256.
 68. **Evenson DP.** Flow cytometric analysis of male germ cell quality. *Methods Cell Biol* 1990; 33: 401-410.
 69. **Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR.** Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry. *Chromosoma* 1980; 78: 225-238.



Dendropsophus sp. (Rana)
Rio Tiquie, Vaupes, Colombia.
Cortesia de Alejandro Campuzano Zuluaga.