



Análisis de la fragmentación del ADN de espermatozoides humanos mediante el test de dispersión de la cromatina espermática: origen, causas e impacto en reproducción asistida

Rebeca Santiso Brandariz

Tesis doctoral 2013

Tesis realizada bajo la dirección del

Dr. José Luis Fernández García

Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)

Centro Oncológico de Galicia (COG)

Departamento de Biología Celular y Molecular

Universidade da Coruña

JOSÉ LUIS FERNÁNDEZ GARCÍA, Doctor en Medicina y Cirugía, jefe del grupo de Genética del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y jefe de servicio del Laboratorio de Biología Molecular y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia,

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral, titulada “Análisis de la fragmentación del ADN de espermatozoides humanos mediante el test de dispersión de la cromatina espermática: origen, causas e impacto en reproducción asistida”, que para optar al título de Doctora en Biología presenta Doña **Rebeca Santiso Brandariz**, ha sido realizada bajo mi dirección en el laboratorio de Genética del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y en el Laboratorio de Biología Molecular y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia y que, hallándose concluida, autorizo su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

A Coruña, 16 de octubre de 2013

Fdo. José Luis Fernández García

HORACIO NAVEIRA FACHAL, Doctor en Biología, Catedrático de Genética de la Universidad de A Coruña,

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral, titulada “Análisis de la fragmentación del ADN de espermatozoides humanos mediante el test de dispersión de la cromatina espermática: origen, causas e impacto en reproducción asistida”, presentada por Doña **Rebeca Santiso Brandariz** para optar al título de Doctora en Biología y dirigida por el Dr. José Luis Fernández García, ha sido realizada bajo mi tutela.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

A Coruña, 16 de octubre de 2013

Fdo. Horacio Naveira Fachal

A mis padres

A Txemi

Agradecimientos

Cuando era una niña quería ser científica y hacer un gran descubrimiento que cambiaría el mundo. La primera parte de mi sueño, la de ser científica, se ha cumplido y, poco a poco, la ciencia se ha ido colando hasta en los aspectos más cotidianos de mi vida. A lo largo de estos años he sentido la emoción que te embarga cuando un experimento sale bien, la alegría de obtener una $p < 0,05$ o la satisfacción de ver tu trabajo publicado. He sentido la frustración y la desesperación de largos días de trabajo que termina en la basura. Y he comprendido que sin los días malos no existirían los buenos o, al menos, no serían tan buenos. He aprendido a ser más observadora, a analizar las cosas de manera objetiva y a no emitir un juicio sin ponerme antes (aunque sea un poco) en el lugar del otro. He aprendido el verdadero significado de paciencia. He aprendido a caminar por el mundo de manera despierta, inquieta, atenta y curiosa. Obviamente, el gran descubrimiento que cambiaría el mundo no ha llegado, pero la ciencia ha cambiado mi mundo, mi manera de ver, entender y sentir el mundo.

Todo esto no hubiera sido posible de no ser por todos los que me han acompañado durante este largo camino.

Gracias al Dr. José Luis Fernández, por darme la oportunidad de hacer esta tesis con él. Por introducirme en el mundo del daño en el ADN, del que me enseñó todo lo que sé. Por asombrarme cada día con sus ideas. Por enseñarme que el trabajo duro tiene recompensa. Por demostrarme que ser grande no está reñido con ser humilde.

Gracias al Dr. Horacio Naveira, por ser el primero que confió en mí y por enseñarme la base de todo lo que sé ahora. Por apasionarme con sus clases de evolución. Por despertar en mí la necesidad de saber más. Por aquellos maravillosos años en los que vivía rodeada de moscas y que, en su día, tanto me costó dejar atrás.

Gracias a mis compis del laboratorio, con quienes he compartido miles de momentos que siempre llevaré en mi corazón. A Mari, mi compañera de fatigas, por tantas cosas vividas juntas, por tantas risas y algún que otro lloro, por nuestras conversaciones, nuestros momentos de cotilleo, por tantas emociones, ¡por los viajes!, por las largas tardes de gominolas y confidencias esperando a que los espermatozoides se fragmentaran, por la complicidad. A Nere, por enseñarme qué debo hacer si me ataca un *Tyrannosaurus rex*. A Fati, siempre pendiente de los demás, siempre dispuesta a ayudar. A Arantxa y a Raquel, por los buenos tiempos pasados juntas. También a los que ya no están en el laboratorio. A Beli, una rebelde, aunque no siempre

tenga causa, una verdadera amiga y la persona más generosa que conozco. A Lourdes, mi profe de espermatozoides, por su alegría. A Alex, con quien conversar siempre es un placer. A Su, por su dulzura.

Gracias a Fernando Cachafeiro, director gerente del Centro Oncológico de Galicia, por permitirme desarrollar este trabajo en el Laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología. Antes de trabajar aquí, jamás hubiera pensado que podría llegar a sentirme como en casa en un hospital oncológico. A Lucía Cachafeiro, por ayudarme siempre que lo he necesitado. A los chicos del servicio de Radioterapia, en especial a Carlos Fernández y a José Manuel Fandiño, por la ayuda prestada con los experimentos de radiación. A los chicos del servicio de informática, por sacarme de tantos apuros. A todas las chicas con las que coincido en el área de descanso, en especial a Caro, por los desayunos tan amenos. Y al resto de trabajadores del centro, por el trato cariñoso en el día a día.

Gracias a los chicos del Instituto Valenciano de Infertilidad, muy especialmente al Dr. Marcos Meseguer, sin cuya ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias a mis compañeros del materno, Alex, Doro, Rosa, Montse, Iria, Silvia, Loli, Charo, Berta, Cristina, Elisa, por hacerme un hueco siempre que lo necesito y por hacerme sentir una más entre ellos.

Gracias a mis compañeros del INIBIC, siempre dispuestos a echarme una mano cuando lo he necesitado.

Gracias a mis amigos, a los del mundo científico y a los del mundo normal, como ellos mismos se definen. A unos por entenderme y a los otros por intentarlo. Una mención especial a todos los donantes que, voluntariamente, me han ayudado en mis experimentos.

Gracias a mis padres, por acompañarme con su amor, apoyo incondicional, comprensión y confianza a lo largo de todos los caminos que he emprendido durante mi vida. Esta tesis es suya. A mi hermana Lucía y a mi “casi hermana” Marián, mis mejores amigas, porque desde siempre lo hemos compartido todo. A Alba, la niña de mis ojos, que con una sonrisa es capaz de borrar todos los problemas y preocupaciones. A mis tíos, mis segundos padres. A Suso, por regalarme la mejor sobrina del mundo. A mis abuelos, con especial cariño a mis abuelas Pilar ¡Cuánto hubieran disfrutado de todo

esto! Gracias a Ana, a Cheche, a Ane y a Elenita, por hacerme un hueco en su familia.

Gracias a Txemi, mi otra mitad, por estar siempre a mi lado. Por su amor y su cariño. Por su apoyo y comprensión. Por su paciencia. Por las poesías y canciones que se inventa sobre mí y que tanto me hacen reír. Por hacerme la vida bonita y alegre. Por hacerme feliz.

Por último, gracias a la suerte, por haber combinado todas las variables de tal manera que todo haya pasado, exactamente, como ha pasado.

Resumen

Resumen de la tesis

Los hombres infértiles presentan una mayor proporción de espermatozoides con ADN fragmentado que los hombres fértiles, aunque un cierto porcentaje de estas células siempre está presente en todas las muestras seminales.

Esta tesis se centra en el estudio de ciertas cuestiones básicas y clínicas acerca de la fragmentación del ADN espermático.

Desde el punto de vista de la investigación básica, nuestros resultados indican que el estrés oxidativo se relaciona con la fragmentación del ADN observada en los espermatozoides. Además, la matriz proteica nuclear también está afectada en aquellos espermatozoides con el ADN fragmentado.

Con respecto al impacto clínico, constatamos que el cáncer y la infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* incrementan la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado, lo cual podría contribuir a la infertilidad observada en estos pacientes.

En relación al efecto en reproducción asistida, hemos observado que, aunque la fragmentación del ADN espermático afecta negativamente a la probabilidad de obtener un embarazo, un ovocito de buena calidad podría superar el impacto negativo de la fragmentación.

Por último, en el contexto de la toxicología reproductiva, el estudio dinámico de la fragmentación del ADN espermático fue capaz de revelar daño latente en el espermatozoide, que no era evidente inicialmente tras la exposición a niveles tóxicos de ciertos agentes.

Resumo da tese

Os homes infértiles presentan unha maior proporción de espermatozoides co ADN fragmentado que os homes fértiles, aínda que certa porcentaxe destas células sempre está presente en todas as mostras seminais.

Esta tese céntrase no estudo de certas cuestións básicas e clínicas acerca da fragmentación do ADN espermático.

Dende o punto de vista da investigación básica, os nosos resultados indican que o estrés oxidativo se relaciona coa fragmentación do ADN observada nos espermatozoides. Ademais, a matriz proteica nuclear tamén está afectada naqueles espermatozoides co ADN fragmentado.

Con respecto ao impacto clínico, constatamos que o cancro e a infección por *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma sp.* producen un aumento na frecuencia de espermatozoides co ADN fragmentado, o cal podería contribuír á infertilidade observada nestes pacientes.

En relación ao efecto en reprodución asistida, observamos que, aínda que a fragmentación do ADN espermático afecta negativamente á probabilidade de obter un embarazo, un ovocito de boa calidade podería superar o impacto negativo da fragmentación.

Por último, no contexto da toxicoloxía reprodutiva, o estudo dinámico da fragmentación do ADN espermático foi capaz de revelar dano latente no espermatozoide que non era evidente inicialmente tras a exposición a niveles tóxicos de certos axentes.

Summary of the thesis

Infertile men have higher proportion of sperm with fragmented DNA than fertile men, although certain percentage of these cells is always present in all seminal samples.

This thesis focuses on the study of certain basic and clinical questions about sperm DNA fragmentation.

From the point of view of the basic research, our results show that oxidative stress is associated with the DNA fragmentation observed in the sperm. Moreover, the nuclear protein matrix is also affected in sperm with fragmented DNA.

Regarding the clinical impact, we found that cancer and infection caused by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma sp.* increase the frequency of sperm with fragmented DNA, which could contribute to infertility observed in these patients.

In relation to the effect on assisted reproduction, we observed that, although sperm DNA fragmentation negatively affects the probability of a pregnancy, oocyte quality could overcome the negative impact of fragmentation.

Finally, within the context of reproductive toxicology, the dynamic assessment of sperm DNA fragmentation may reveal cryptic damage in the sperm, which was not evident immediately after the exposure to toxic levels of certain agents.

Índice

Introducción	25
1. El espermatozoide humano.....	27
2. Espermatogénesis.....	28
3. Remodelación de la cromatina espermática.....	34
4. Estructura de la cromatina del espermatozoide humano.....	41
5. Fragmentación del ADN espermático.....	48
5.1. ¿Qué mecanismos inducen la fragmentación del ADN espermático?.....	49
5.2. Técnicas para la evaluación del daño en el ADN espermático.....	57
5.3. Causas del daño en el ADN espermático.....	66
5.4. Significado clínico del daño en el ADN espermático.....	71
5.5. ¿Es seguro el uso de espermatozoides con daño en el ADN en reproducción asistida?.....	78
Objetivos	83
Material y Métodos	89
Objetivo 1. Estudio de la relación entre la fragmentación y la presencia de 8-oxoG en el ADN de espermatozoides humanos.....	91
Objetivo 2. Estudio de la matriz nuclear en células espermáticas con el ADN fragmentado.....	97
Objetivo 3. Evaluación de la longitud media de la secuencia de ADN telomérico y su relación con la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos.....	101
Objetivo 4. Estudio del efecto del cáncer sobre la fragmentación del ADN espermático.....	105
Objetivo 5. Estudio del efecto de la infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Mycoplasma sp.</i> sobre la fragmentación del ADN espermático.....	107
Objetivo 6. Cuantificación del efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre el resultado en reproducción asistida.....	111
Objetivo 7. Evaluación de la dinámica de la fragmentación del ADN espermático como indicador en toxicología reproductiva.....	115

Resultados y Discusión	119
Objetivo 1. Estudio de la relación entre la fragmentación y la presencia de 8-oxoG en el ADN de espermatozoides humanos.	121
Objetivo 2. Estudio de la matriz nuclear en células espermáticas con el ADN fragmentado.....	135
Objetivo 3. Evaluación de la longitud media de la secuencia de ADN telomérico y su relación con la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos.....	145
Objetivo 4. Estudio del efecto del cáncer sobre la fragmentación del ADN espermático.	153
Objetivo 5. Estudio del efecto de la infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Mycoplasma sp.</i> sobre la fragmentación del ADN espermático.....	159
Objetivo 6. Cuantificación del efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre el resultado en reproducción asistida.	169
Objetivo 7. Evaluación de la dinámica de la fragmentación del ADN espermático como indicador en toxicología reproductiva.....	183
Valoración final	209
Conclusiones	213
Bibliografía	219
Apéndice I: Abreviaturas	257
Apéndice II: Índice de figuras y tablas	265
Apéndice III: Curriculum vitae	275
Apéndice IV: Artículos publicados	291

Introducción



1. El espermatozoide humano.

En la especie humana, los gametos, masculino y femenino, son radicalmente diferentes entre sí. El óvulo es una de las células más grandes del organismo; el espermatozoide es la más pequeña. El óvulo y el espermatozoide están optimizados de forma complementaria para la propagación de los genes que transportan. El óvulo permite la supervivencia de los genes maternos, proporcionándoles grandes reservas de materiales alimenticios para su crecimiento y desarrollo y una efectiva envoltura protectora. El espermatozoide, por el contrario, está optimizado para propagar los genes paternos, siendo altamente móvil e hidrodinámico para tener velocidad y eficiencia en la tarea de la fecundación.

El espermatozoide maduro es una célula extremadamente especializada, diseñada exclusivamente para transmitir un genoma haploide a la descendencia (Figura 1). Para ello, cuenta con un potente flagelo que le permite desplazarse a través de un medio acuoso y carece de orgánulos citoplasmáticos como ribosomas, retículo endoplasmático o complejo de Golgi, los cuales son innecesarios para la tarea de ceder el ADN al óvulo. Por otro lado, el espermatozoide presenta muchas mitocondrias colocadas estratégicamente en el lugar donde pueden accionar el flagelo con mayor eficiencia. El espermatozoide está formado por dos regiones morfológica y funcionalmente diferentes, rodeadas por una misma membrana plasmática: la cabeza, que contiene un núcleo haploide extremadamente condensado, y la cola, que impulsa al espermatozoide hacia el óvulo y le ayuda a penetrar a través de la envoltura del óvulo. El ADN del núcleo es inactivo y está densamente empaquetado, de modo que su volumen está reducido al mínimo para su transporte.

La cabeza del espermatozoide debe tener un contorno regular y ligeramente oval (World Health Organization 2010). En la parte anterior de la cabeza del espermatozoide, se encuentra una vesícula secretora especializada, denominada acrosoma. El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas que ayudan al espermatozoide a atravesar la envoltura externa del óvulo. Cuando un espermatozoide entra en contacto con un óvulo, el contenido del acrosoma se libera por exocitosis, en la denominada reacción acrosómica. La parte posterior de la cabeza está ocupada por el núcleo haploide.

La cola móvil de un espermatozoide es un largo flagelo cuyo axonema central sale de un corpúsculo basal situado inmediatamente detrás del

núcleo. El movimiento flagelar está impulsado por la hidrólisis del ATP generado por las mitocondrias, situadas en la parte anterior de la cola del espermatozoide, denominada pieza intermedia (Alberts *et al.* 1994).

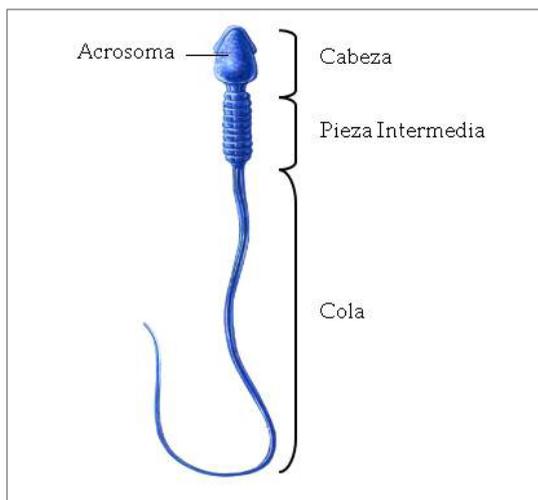


Figura 1. Morfología de un espermatozoide humano maduro normal (Alberts *et al.* 1994).

2. Espermatogénesis.

La espermatogénesis es el proceso por el cual una población de células germinales compleja e interdependiente produce espermatozoides. La espermatogénesis empieza en la pubertad y desde entonces se produce de manera continua, en los túbulos seminíferos, hasta la vejez. Los túbulos seminíferos son unos tubos muy largos y densamente enrollados que ocupan el 60 - 80% del volumen testicular. El testículo humano está dividido por tabiques de tejido conjuntivo en 250 - 300 lóbulos, cada uno de los cuales contiene 2 - 3 túbulos seminíferos de 30 a 80 cm de longitud. En total, existen entre 600 y 1200 túbulos seminíferos en cada testículo, que representan una longitud aproximada de 250 m y que confluyen a la *rete testis* para formar de 6 a 12 conductos eferentes, cuya acción es llevar líquido y espermatozoides a la cabeza del epidídimo. El epidídimo es un tubo densamente enrollado que mide alrededor de 6 m de longitud y consta de cabeza, cuerpo y cola. El epidídimo cumple principalmente tres funciones: almacenamiento transporte y maduración de los espermatozoides. Los túbulos seminíferos están formados por el epitelio germinal y el tejido peritubular o lámina

propia. El epitelio germinal contiene las células germinales, que se encuentran en diferentes etapas de su desarrollo y están localizadas en invaginaciones de las células de Sertoli. Estas células, además de servir de soporte, nutren a las células germinales durante su desarrollo y participan en la regulación de la espermatogénesis. Las células de Sertoli están conectadas entre sí a través de sus membranas por medio de uniones muy estrechas, separando el epitelio germinal en dos compartimentos: el compartimento basal y el compartimento adluminal. Estas zonas especializadas forman la barrera hematotesticular de los testículos, que aísla de manera inmunológica a las células germinales cuando pasan al compartimento adluminal (Figura 2) (Holstein *et al.* 2003).

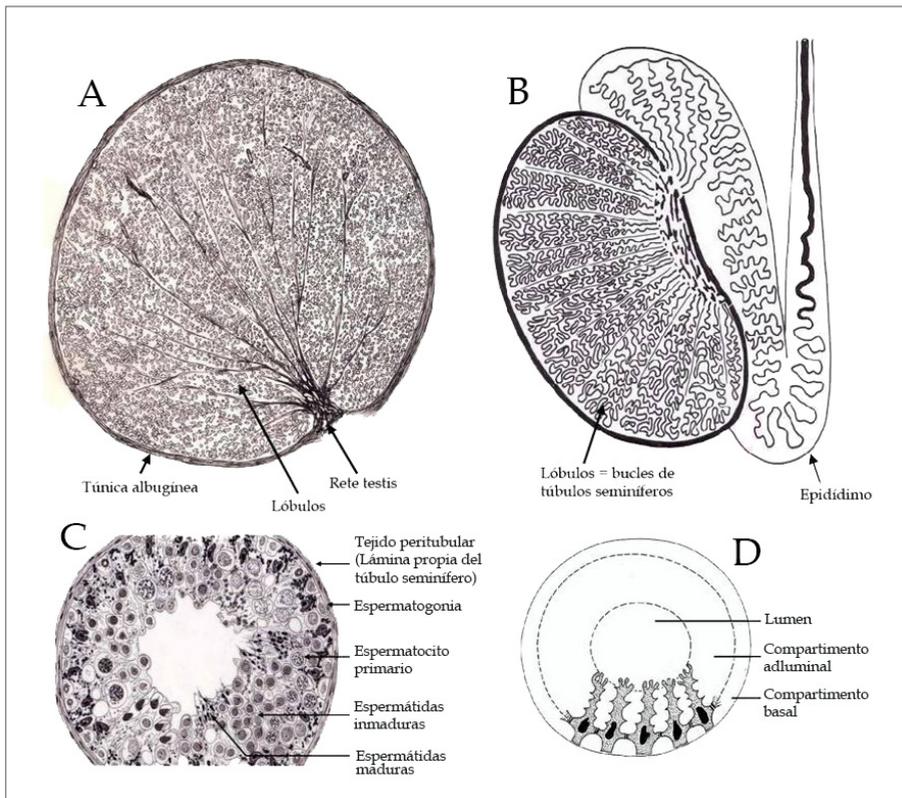


Figura 2. (A) Corte transversal de un testículo humano. Dibujo de un corte de parafina 2,5×. (B) Disposición de los túbulos seminíferos y del epidídimo en el testículo humano. Dibujo esquemático. (C) Sección transversal de un túbulo seminífero de un hombre fértil de 32 años. Dibujo de una sección fina 300×. (D) Las células de Sertoli dividen el epitelio germinal en compartimento basal y adluminal (Holstein *et al.* 2003).

En la espermatogénesis se pueden diferenciar principalmente tres fases: espermatogoniogénesis, maduración de espermatocitos y espermiogénesis, que consiste en la citodiferenciación de las espermátidas.

Espermatogoniogénesis

Las células germinales inmaduras, denominadas espermatogonias, están situadas a lo largo del borde externo de los túbulos seminíferos, junto a la lámina basal, donde se dividen continuamente por mitosis. Las divisiones celulares de las espermatogonias generalmente son incompletas. Las células hijas permanecen interconectadas por medio de puentes citoplasmáticos, de manera que un clon derivado de una célula madre forma un sincitio de células. Las conexiones sincitiales no se disuelven hasta fases avanzadas del desarrollo de la espermátida. Se cree que la formación de estos clones es la base del desarrollo sincrónico de las células germinales.

Hay varios tipos de espermatogonias, que se diferencian por su posición en la parte basal del epitelio germinal, por su morfología y por cómo se tiñen con diferentes colorantes: espermatogonias tipo A pálidas, espermatogonias tipo A oscuras y espermatogonias tipo B. Las espermatogonias tipo A pertenecen al grupo de células madre de la espermatogénesis, mientras que las espermatogonias tipo B dejan de proliferar y comienzan su desarrollo a espermátidas.

Son necesarios los dos tipos A de espermatogonias para que la espermatogénesis se desarrolle con normalidad. En casos de espermatogénesis reducida, a menudo están ausentes las espermatogonias de tipo A oscuras. Por supuesto, si faltan ambos tipos de espermatogonias, la espermatogénesis no tendría lugar y el epitelio germinal consistiría únicamente en células de Sertoli. En el caso de que la espermatogonia no sea capaz de desarrollarse a espermatogonia tipo B, la espermatogénesis quedaría parada en la fase de espermatogonia (Holstein *et al.* 2003).

Meiosis de los espermatocitos

Las espermatogonias que entran en meiosis se denominan espermatocitos. Como el proceso de la meiosis comprende dos divisiones, las células antes

de la primera división meiótica se denominan espermatoцитos primarios y después de la segunda división, espermatoцитos secundarios.

Los espermatoцитos primarios son las células germinales más grandes del epitelio germinal. La meiosis de los espermatoцитos comienza con la fase de leptotene de la profase, en el compartimento basal del epitelio germinal. Tras pasar la barrera de las células de Sertoli, los espermatoцитos alcanzan el compartimento adluminal y continúan con las siguientes fases de la profase, llamadas zigotene, paquitene y diplotene. Durante la profase tiene lugar la replicación del ADN, la condensación de los cromosomas, el apareamiento de cromosomas homólogos y el entrecruzamiento. Tras la división, las células germinales son espermatoцитos secundarios, que se volverán a dividir, sin replicar el ADN, para dar espermátidas. Las dos divisiones de maduración de cada espermatoцитo dan como resultado cuatro espermátidas haploides. Las espermátidas haploides todavía siguen interconectadas por puentes citoplasmáticos que permiten que el desarrollo se produzca de manera sincrónica. Se ha propuesto que estos puentes intercelulares permiten el intercambio de proteínas y productos génicos, de manera que, aunque las espermátidas son genéticamente haploides, podrían expresar proteínas como si fueran diploides (Oliva *et al.* 1988).

Se conocen muchos defectos de meiosis, lo cual indica la vulnerabilidad de este complicado proceso. Es frecuente encontrar espermatoцитos apoptóticos y, a menudo, la espermatogénesis se detiene en la fase de espermatoцитos primarios sin que exista ningún cambio especial en la morfología de las células (Holstein *et al.* 2003).

Espermiogénesis

El proceso de diferenciación de las espermátidas a espermátidas maduras se denomina espermiogénesis. Este proceso termina con la liberación de las células del epitelio germinal. En este punto, las células libres ya se denominan espermatozoides. Durante la citodiferenciación de las espermátidas, tienen lugar tres procesos (Figura 3):

- Condensación de la cromatina nuclear hasta una décima parte del volumen que ocupa en una espermátida inmadura.
- Formación del acrosoma por el aparato de Golgi.
- Desarrollo de las estructuras del flagelo e implantación en el núcleo.

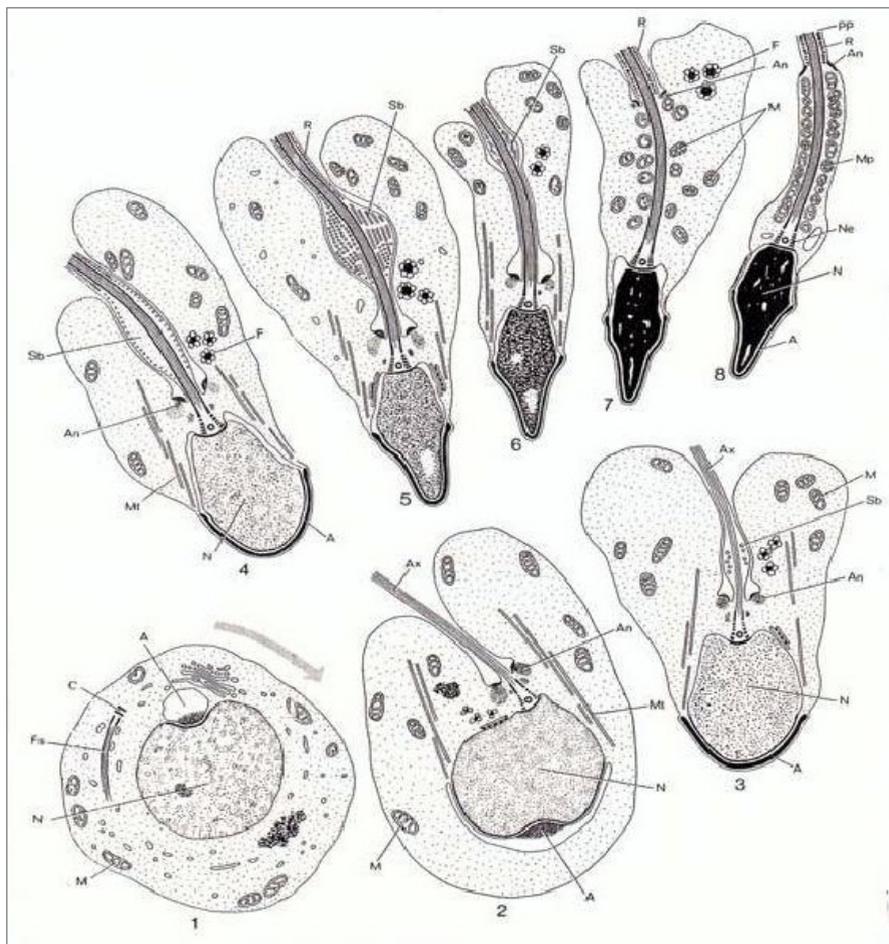


Figura 3. Pasos de la diferenciación de las espermátidas: (1) Espermátidas inmaduras con el núcleo (N) con forma redonda. La vesícula acrosómica (A) está unida al núcleo. (2) La vesícula acrosómica ha aumentado y se ha aplanado sobre el núcleo. La cola contacta con el núcleo. (3-8) Formación del acrosoma, condensación nuclear y desarrollo de las estructuras de la cola. La espermátida madura (8) es liberada del epitelio germinal. Dibujo esquemático basado en imágenes del microscopio electrónico (Holstein *et al.* 2003).

Es muy normal encontrar un gran número de espermátidas con malformaciones, que pueden afectar al acrosoma, al núcleo, al flagelo, o ser una combinación de éstas.

Una vez se han desarrollado las espermátidas, éstas ya poseen la configuración que les permite abandonar el epitelio germinal mediante un complejo proceso dirigido por las células de Sertoli, denominado espermiación. Durante la espermiación, las espermátidas maduras cierran

sus puentes intercelulares, se desconectan del epitelio germinal y se convierten en células libres, ahora llamadas espermatozoides. Durante este proceso también se liberan pequeñas partes de la espermátida en las que se acumulan gránulos de ARN, algunas mitocondrias, gotas lipídicas y membranas, formando los llamados cuerpos residuales, que serán mayoritariamente incorporados y digeridos por las células de Sertoli.

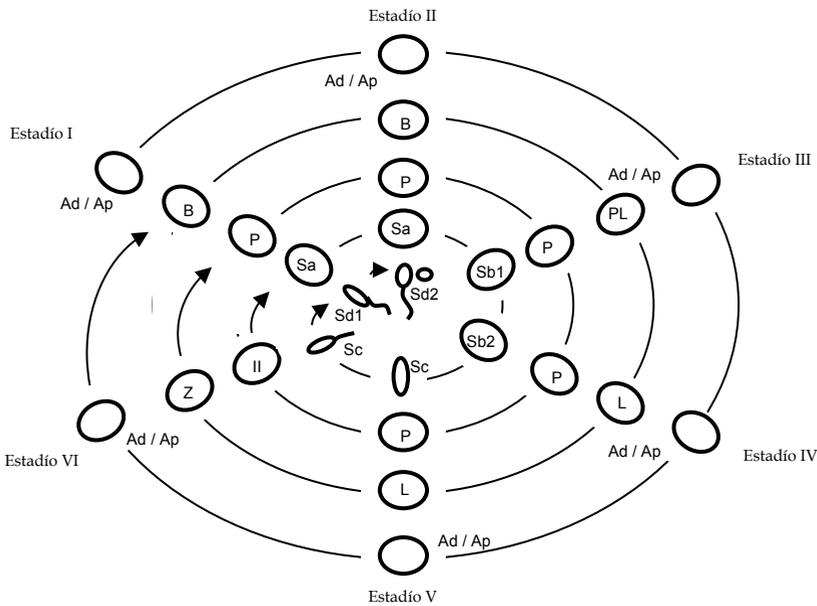


Figura 4. Cinética de la espermatogénesis. Los ciclos (4,5) y estadios (6) de la espermatogénesis se disponen según un patrón helicoidal. Tipos de espermatogonias: Ad (A oscura), Ap (A clara), B. Tipos de espermatocitos primarios: PL (preleptoteno), L (leptoteno), Z (zigoteno), P (paquitenio). Espermatocitos secundarios: II. Fases de la espermiogénesis: Sa (fase de Golgi), Sb1 y Sb2 (fase de capuchón), Sc (fase de acrosoma), Sd1 y Sd2 (fase de maduración). (Remohí *et al.* 2002).

La espermatogénesis es un proceso altamente organizado y su cinética sigue un patrón específico (Figura 4). En cada sección histológica de un túbulo seminífero no se observan todos los tipos de células germinales al mismo tiempo, sino que aparecen en forma de asociaciones celulares denominadas estadios. Su número depende de la especie y en humanos son seis. Desde que una espermatogonia empieza el proceso de diferenciación celular hasta que se diferencia en espermatozoide maduro transcurren 4,6 ciclos. La

duración de cada ciclo es de aproximadamente 16 días, así que la duración total de la espermatogénesis es de 74 días. Las espermátidas maduras liberadas por el epitelio germinal como espermatozoides son transportadas a través del epidídimo durante otros 12 días más. De esta manera, un ciclo de espermatogénesis completo, desde espermatogonia a espermatozoide maduro, durará como mínimo 86 días (Holstein *et al.* 2003).

3. Remodelación de la cromatina espermática.

El empaquetamiento de la cromatina de las células espermáticas es completamente diferente al de las células somáticas (Ward 1993; Barone *et al.* 1994). Este gran cambio en la estructura de la cromatina tiene lugar en el transcurso de la espermiogénesis, durante la cual se adquieren la mayoría de los rasgos del espermatozoide maduro, incluyendo la forma de la cabeza específica de especie. Hay un gran desconocimiento acerca de cómo ocurre este proceso que implica la disgregación de los nucleosomas somáticos y el reemplazamiento de las histonas por pequeñas proteínas muy básicas, que en humanos son las proteínas de transición y las protaminas (Steger *et al.* 1998; Wouters-Tyrou *et al.* 1998).

Uno de los primeros cambios que sufre la cromatina en la transición de nucleohistonas a nucleoprotaminas es la incorporación de variantes histónicas. Las variantes histónicas son formas no alélicas de las histonas convencionales. Las histonas convencionales se sintetizan y ensamblan principalmente durante la fase S del ciclo celular, mientras que las variantes histónicas pueden ser producidas e incorporadas a lo largo de todo el ciclo. Se han descrito variantes histónicas específicas de testículo, pero también hay muchas variantes histónicas no específicas de tejido que también se expresan e incorporan en la cromatina durante la espermatogénesis. No se sabe cómo actúa específicamente sobre la estructura y función de la cromatina cada variante histónica, pero, dado que la base estructural fundamental de los nucleosomas se encuentra muy bien conservada a lo largo de la evolución, se postula que estas variantes histónicas podrían formar nucleosomas inestables, los cuales constituirían una diana preferencial para el reemplazamiento de histonas (Govin *et al.* 2004; Gaucher *et al.* 2010).

Justo antes del desensamblaje de los nucleosomas, durante la espermiogénesis, las histonas son hiperacetiladas y parece que esta hiperacetilación está fuertemente asociada con el reemplazamiento de las histonas (Govin *et al.* 2004; Gaucher *et al.* 2010; Oliva & Castillo 2011). Hay autores que proponen que la combinación de modificaciones postraduccionales (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación) en las histonas podría definir un código histónico. Este código funcionaría como un lenguaje entre las histonas y las actividades que modifican la cromatina y asignaría una estructura y función particular a dominios de la cromatina específicos (Strahl & Allis 2000; Turner 2002; Boussouar *et al.* 2008).

Una vez que los nucleosomas se han desensamblado, las histonas son sustituidas por las proteínas de transición (Meistrich *et al.* 2003). Las proteínas de transición más abundantes y mejor caracterizadas son la TNP1 y la TNP2 y cerca del 90% de las histonas (tanto somáticas como específicas de testículo) son reemplazadas por estas proteínas altamente básicas. La TNP1 es una proteína de 6,5 kDa rica en arginina, lisina y serina (Kimmins & Sassone-Corsi 2005). Hay estudios moleculares que indican que la TNP1 desestabiliza el ADN y reduce la interacción del ADN con los nucleosomas (Singh & Rao 1987; Singh & Rao 1988). La TNP2 es una metaloproteína de zinc de 13 kDa y se ha observado en estudios *in vitro* que condensa el ADN, preferentemente en zonas ricas en GC, función para la cual depende del zinc. Posee dos dominios funcionales y estructurales. En la parte N-terminal forma dos dedos de zinc y en la parte C-terminal, rica en residuos básicos, contiene el dominio de condensación del ADN (Kundu & Rao 1995; Kundu & Rao 1996; Pradeepa & Rao 2007).

La TNP1 se expresa en abundancia y su secuencia está altamente conservada en diferentes mamíferos. Sin embargo, la secuencia de la TNP2 está poco conservada y sus niveles de expresión varían entre las especies. Ambas están codificadas por genes de copia única, *TNP1* y *TNP2*, respectivamente. *TNP2* se encuentra ligado a los genes de las dos protaminas, sugiriendo que han podido surgir por duplicación génica y que podrían tener funciones comunes. *TNP1*, sin embargo, se encuentra en un cromosoma diferente (Meistrich *et al.* 2003). Se ha demostrado que los ratones knockout para una u otra proteína de transición, *TNP1*^{-/-} o *TNP2*^{-/-}, son menos fértiles que los ratones normales, y sus espermatozoides muestran una condensación anormal de la cromatina (Yu *et al.* 2000; Zhao *et al.* 2001). Sin embargo, el doble knockout para TNP1 y TNP2 es estéril y su espermatogénesis está

seriamente afectada (Zhao *et al.* 2004). El hecho de que la falta de una de las proteínas de transición sólo produzca un leve efecto en los ratones knockout que portan la mutación se ha interpretado como que estas proteínas tienen funciones redundantes y solapadas y que la falta de una de ellas puede ser compensada por la otra (Yu *et al.* 2000; Zhao *et al.* 2001). Ésta es una idea bastante difícil de imaginar dadas las grandes diferencias existentes entre ambas, tanto en su estructura molecular como con respecto al comportamiento que presentan con el ADN en estudios *in vitro*.

Finalmente, las proteínas de transición son sustituidas por las protaminas para formar un complejo de nucleoprotaminas altamente compacto (Oliva & Castillo 2011). Las protaminas son pequeñas proteínas con un alto contenido en aminoácidos cargados positivamente, particularmente arginina (48% en las protaminas humanas). En mamíferos se conocen dos tipos de protaminas: la PRM1 y la familia de las PRM2. La PRM1 está presente en todas las especies de vertebrados estudiadas, mientras que la familia PRM2, formada por los componentes PRM2, PRM3 y PRM4, sólo está presente en algunas especies de mamíferos, incluyendo humanos y ratón (Oliva 2006).

Las protaminas son unas de las proteínas que presentan una mayor tasa de evolución y hay evidencias de que han evolucionado a partir de la histona H1 (Lewis *et al.* 2004; Eirín-López *et al.* 2006). A lo largo de la evolución, las protaminas han ido incrementando el número de residuos con carga positiva, lo cual les permite interactuar con el ADN formando complejos con un alto grado de condensación. Además, las protaminas de diferentes especies incorporan cisteínas en su secuencia, permitiendo la formación de puentes disulfuro entre moléculas de protamina adyacentes, que aportan una gran estabilidad al complejo de nucleoproteínas (Lewis *et al.* 2003; Oliva 2006). En humanos, las protaminas están codificadas por genes de copia única (*PRM1* y *PRM2*) y se localizan en el cromosoma 16. La PRM1 se sintetiza como una proteína madura, mientras que los componentes de la familia PRM2 son generados por la proteólisis de un precursor codificado por el gen *PRM2*. Los miembros de la familia PRM2 difieren únicamente en la extensión del extremo N-terminal (de 1 a 4 residuos) y el componente PRM2 es el más abundante dentro de esta familia (Oliva & Dixon 1991; Oliva 2006).

Se ha demostrado que la mayor parte de los residuos de serina de las protaminas están fosforilados antes de unirse al ADN y que son desfosforilados cuando se forma el complejo final de nucleoprotaminas.

Como el efecto de la fosforilación de la serina es conferir carga negativa a los residuos modificados, se cree que esta modificación tiene la función de modular la interacción de las proteínas con el ADN, confiriéndoles un efecto más plástico y permitiendo que, si se forman complejos ADN-protaminas de manera incorrecta, se puedan resolver y reformar. Una vez se han establecido los complejos de nucleoprotaminas de manera correcta, la desfosforilación completa de la protaminas incrementaría la fuerza de la interacción iónica y fomentaría la condensación y la estabilidad del núcleo espermático. Una hipótesis alternativa sería que las cargas negativas de los residuos de serina fosforilados podrían servir como puntos de unión a otras protaminas mediante el establecimiento de interacciones electrostáticas protamina-protamina con los residuos de arginina positivamente cargados. De esta manera, los residuos de serina fosforilados servirían para reducir la atracción electrostática entre el ADN y las protaminas, permitiendo una asociación ordenada de grandes complejos macromoleculares (protamina-protamina) con el ADN, lo cual sería imposible con protaminas no modificadas cuya unión al ADN es tan fuerte (Oliva & Dixon 1991).

El contenido de PRM1 en el núcleo espermático humano es similar al contenido de PRM2 (ratio PRM1/PRM2 \approx 1) y parece que se requiere una estricta regulación de este ratio para mantener la fertilidad del espermatozoide humano. Hay numerosos estudios que relacionan desequilibrios en el ratio PRM1/PRM2 con un descenso en la calidad seminal, un aumento de la fragmentación del ADN espermático (SDF) y un descenso en la capacidad del espermatozoide para fecundar al óvulo (Carrell & Liu 2001; Aoki *et al.* 2005a; Aoki *et al.* 2005b; Aoki *et al.* 2006a; Aoki *et al.* 2006b; Torregrosa *et al.* 2006; Carrell *et al.* 2007). Cuando se estudian los niveles de PRM1 y PRM2 en espermatozoides individuales, se observa que existe una gran variabilidad dentro de la población espermática de cada individuo (Aoki *et al.* 2006a).

El proceso completo de remodelación de la cromatina da lugar a un empaquetamiento unas seis veces mayor que el que presenta la cromatina en cromosomas mitóticos (Boissonneault 2002) y hay muchos autores que postulan que es necesario que se produzcan roturas a lo largo de la cadena de ADN para que el cambio en la topología del ADN, que acompaña a este proceso, tenga lugar (McPherson & Longo 1992; Sakkas *et al.* 1995; Levesque *et al.* 1998; Kierszenbaum 2001; Meyer-Ficca *et al.* 2005). La eliminación de las histonas y la pérdida de los nucleosomas resultan en la formación de superenrollamientos negativos, que a su vez inducen estrés torsional en la

cadena de ADN (Risley *et al.* 1986). Las proteínas de transición y las protaminas estabilizan un ADN con una conformación más lineal y relajada, con lo cual, es necesario eliminar los superenrollamientos de la cadena de ADN para que el intercambio de histonas por proteínas de transición y a continuación por protaminas tenga lugar. McPherson y Longo (1992) fueron los primeros en observar, en ratas, que durante la fase de diferenciación de las espermátidas, en los pasos 12 - 13, coincidiendo con el momento del reemplazamiento de histonas, la cromatina presentaba una gran cantidad de roturas endógenas. También demostraron que, en los pasos 15 - 19 de la diferenciación, las espermátidas ya no presentaban roturas, dejando patente la naturaleza transitoria de las mismas. Ellos sugieren que las roturas podrían aliviar el estrés torsional y ayudar en la remodelación de la cromatina y que estas roturas, presentes en los pasos 12 - 13, eran reparadas durante la maduración del espermatozoide (McPherson & Longo 1992; McPherson & Longo 1993). Posteriormente, otros autores confirman estos resultados en ratones (Sakkas *et al.* 1995; Marcon & Boissonneault 2004) y humanos (Marcon & Boissonneault 2004) y demuestran que la mayor parte de las roturas que se producen son de doble cadena (Laberge & Boissonneault 2005). Con respecto a la identidad de la enzima responsable de crear estas roturas, las topoisomerasas de tipo II parecen ser las candidatas perfectas para realizar estas tareas, debido a su habilidad para crear roturas de doble cadena y catalizar su religación (Roca & Mezquita 1989; McPherson & Longo 1993; Chen & Longo 1996; Cobb *et al.* 1997; Laberge & Boissonneault 2005). Se ha detectado la presencia de topoisomerasa II en espermátidas en fase de diferenciación de ratas (McPherson & Longo 1993; Chen & Longo 1996) y pollos (Roca & Mezquita 1989) y, más concretamente, topoisomerasa II β (TOP2B) en espermátidas de ratón (Leduc *et al.* 2008). Al igual que otras topoisomerasas de tipo II, TOP2B es capaz de eliminar un superenrollamiento del ADN por medio de la generación de una rotura de doble cadena a través de la cual una segunda hélice de ADN puede pasar antes de que se religue la rotura creada en la cadena de ADN (Wang 2009).

Dado que la principal función de los espermatozoides es llevar una copia del genoma en perfecto estado hasta el ovocito, que después será copiada un trillón de veces durante la vida del embrión que se ha formado, el descubrimiento de este proceso ha dado lugar a preocupaciones acerca de cómo se regula para asegurar que todas las roturas son reparadas de manera correcta. En este aspecto, Meyer-Ficca *et al.* (2011) aportan las primeras evidencias y proponen un modelo para explicar cómo se regulan las roturas

creadas durante la espermatogénesis (Figura 5). Ellos proponen que por cada rotura, y posterior religación, inducida por TOP2B es necesario un ciclo de poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) y poli (ADP-ribosa) glucohidrolasa (PARG). PARP1 es un miembro de una familia de proteínas nucleares que regulan la estructura de la cromatina. Es una proteína dependiente de ADN que permanece enzimáticamente inactiva en ausencia de roturas en el ADN. Cuando se produce una rotura en el ADN, PARP1 se une a ella, a la cual reconoce directamente por medio de su dominio de unión al ADN, y rápidamente consume NAD^+ para sintetizar grandes cantidades de poli (ADP-ribosa) (PAR), un polímero que se une a las proteínas formando largas cadenas ramificadas y actúa como una modificación postraduccional transitoria sobre las proteínas diana a las que se une. El principal, aunque no único, aceptor de PAR es el propio PARP1, el cual se inactiva mediante esta reacción de automodificación. La automodificación de PARP1 resulta en su liberación de la rotura debida a la repulsión electrostática del ADN causada por la alta carga negativa del polímero, permitiendo el acceso de enzimas de reparación al lugar donde se ha producido la rotura. La eliminación y degradación del polímero de PAR por medio de la enzima PARG da lugar a la reconstitución de la actividad de PARP1 y a la liberación de cualquier otra molécula aceptora de PAR, como histonas o topoisomerasas (Meyer-Ficca *et al.* 2005). Meyer-Ficca *et al.* (2011) demuestran por primera vez *in vitro* e *in vivo* que la creación de roturas en la cadena de ADN por medio de TOP2B induce la formación de PAR a través de la activación de PARP1. Estas observaciones les llevan a proponer un modelo según el cual TOP2B se une al ADN (Figura 5, paso 1) e introduce una rotura en la cadena de ADN (Figura 5, paso 2) a la cual se une PARP1. La activación de PARP da como resultado la formación de largas cadenas de PAR, lo que conlleva la automodificación (es decir, inactivación) de la PARP activada unida a la rotura del ADN (Figura 5, paso 3). Esto conlleva la disociación de las proteínas adyacentes, es decir, PARP, TOP2B e histonas, del ADN (Figura 5, paso 4) debido a que estas proteínas pierden su habilidad para unirse al ADN como resultado de la interacción con el polímero que contiene una elevada carga negativa. La eliminación de las histonas de esta zona causa la descondensación del ADN, lo cual facilitaría el intercambio de histonas por proteínas de transición y protaminas. Hasta que PARG elimina los polímeros de PAR, permitiendo así que PARP y TOP2B inicien un nuevo ciclo de actividad enzimática (Figura 5, paso 5), las proteínas pueden permanecer formando complejos con PAR, y por lo tanto inactivas, durante un tiempo (Meyer-Ficca *et al.* 2011).

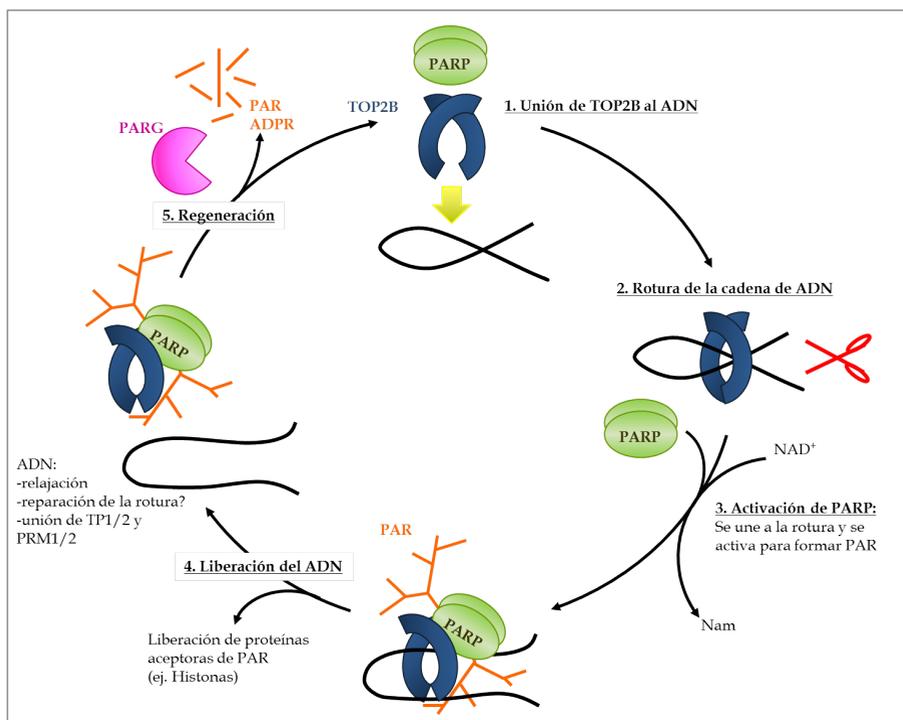


Figura 5. Modelo propuesto por Meyer-Ficca *et al.* (2011) para explicar cómo TOP2B y PARP1 coordinan la relajación del ADN espermático con el intercambio nucleoproteico. TOP2B se une al ADN (1) y genera una rotura en la cadena de ADN (2). Esta rotura desencadena la activación de PARP y consecuentemente la síntesis de PAR (3). La modificación con PAR da lugar a la inactivación catalítica y a la liberación del complejo topoisomerasa-PARP del ADN, junto con otras proteínas aceptoras de PAR, como las histonas (4). Hipotéticamente, el ADN ahora está accesible para la unión con otras proteínas, como proteínas de transición (TNP1/2) y protaminas (PRM1/2). La degradación de PAR por medio de PARG es esencial para restaurar la actividad enzimática del complejo topoisomerasa-PARP que ha sido liberado del ADN (5). Tras eliminar las histonas y relajar el superenrollamiento del ADN, las regeneradas PARP y TOP2B pueden moverse a otro lugar de la cromatina y realizar las mismas acciones (1).

Un aspecto importante de las roturas transitorias producidas por TOP2B es que ellas no son reconocidas por la célula como tales. Cuando TOP2B se une al ADN para producir una rotura de doble cadena, sufre un cambio conformacional, dividiéndose en dos homodímeros y cada uno de los extremos de la rotura se une covalentemente por el extremo 5'OH a un residuo de tirosina de uno de los homodímeros que forman TOP2B. Las roturas de doble cadena causadas por TOP2B no son, por lo tanto, motivos típicos de daño en el ADN y no desencadenan una respuesta al daño en el ADN típica (Meyer-Ficca *et al.* 2011). Así, es probable que PARP reconozca el

cambio conformacional que sufre TOP2B, más que la rotura en sí misma. En este modelo PARP1 se une a una de las conformaciones de TOP2B y parece estimularla para completar el paso de una de las cadenas de ADN a través de la otra, religando, de esta manera, la rotura del ADN. Si es así, esto puede sentar precedente para la regulación de TOP2B en sus otras funciones en apoptosis y en replicación del ADN, es decir, los cambios conformacionales en TOP2B, más que las roturas que produce, podrían iniciar una respuesta celular a las roturas en el ADN (Ward 2011).

4. Estructura de la cromatina del espermatozoide humano.

El empaquetamiento del ADN dentro del núcleo espermático de mamíferos representa uno de los casos más extremos de reorganización del ADN. La cromatina espermática de los mamíferos se divide en tres dominios estructurales:

- El ADN que se encuentra enrollado en toroides por medio de protaminas y que representa la gran mayoría del ADN espermático.
- El ADN que permanece unido a histonas, que constituye un porcentaje mucho menor (2 - 15%).
- El ADN que se une a la matriz nuclear espermática en las regiones de anclaje a la matriz (MARs) a intervalos regulares de aproximadamente 50 kb.

Recientemente, han surgido datos que indican que estos dominios están relacionados con diferentes funciones.

Cromatina espermática unida a protaminas

La gran mayoría de la cromatina espermática se encuentra compactada en toroides que contienen aproximadamente 50 kb de ADN (Hud *et al.* 1993) (Figura 6A). Las protaminas tienen grandes extensiones de residuos de arginina cargados positivamente que neutralizan las cargas negativas del ADN (Balhorn 1982). La unión entre el ADN y las protaminas es tan fuerte

que aporta a este componente del ADN espermático un estado semicristalino resistente a la digestión por nucleasas (Sotolongo *et al.* 2003). Las protaminas de mamíferos también tienen varias cisteínas que podrían aumentar la estabilidad de la cromatina espermática mediante puentes disulfuro intermoleculares (Balhorn *et al.* 1991).

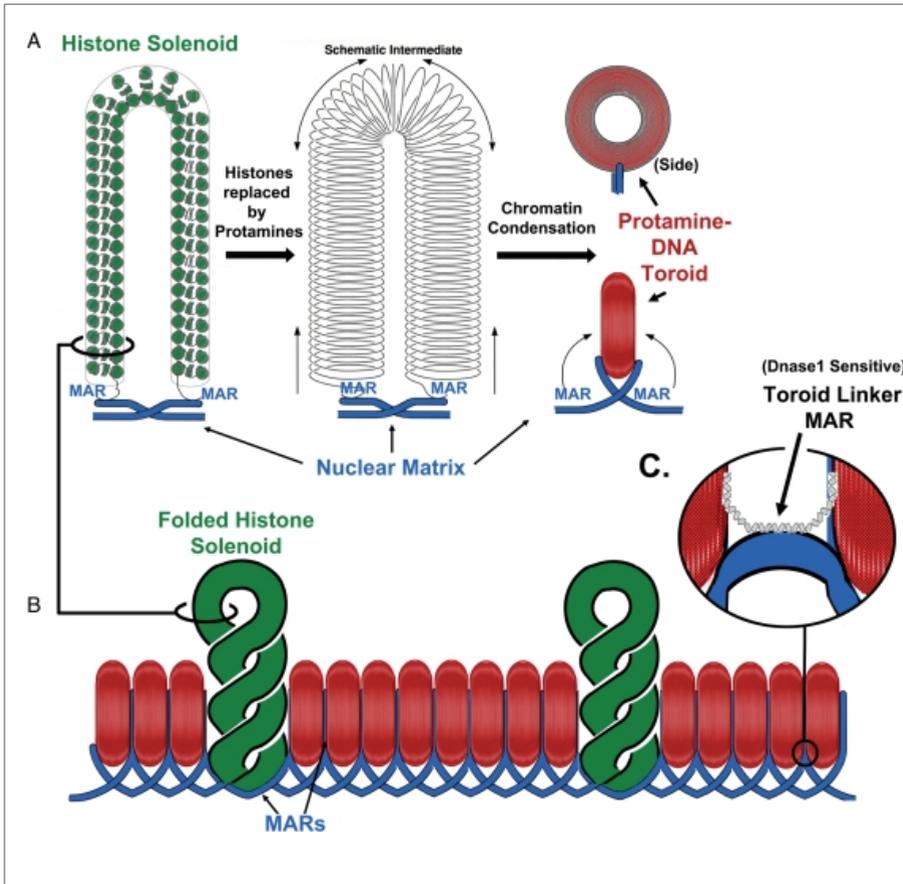


Figura 6. Representación de los tres principales elementos estructurales de la cromatina espermática. (A) Durante la espermiogénesis las histonas son reemplazadas por protaminas, que condensan el ADN en toroides fuertemente empaquetados. Cada toroide de protamina es un dominio bucle. (B) Los toroides de protaminas pueden estar organizados por apilamiento unos al lado de otros. Evidencias recientes sugieren que existen grandes extensiones de ADN que retienen histonas (solenoides verdes). Estas extensiones podrían ser dominios bucle completos que no han sido condensados por protaminas. (C) Las cadenas de ADN que unen los toroides de protaminas son sensibles a las nucleasas, y también podrían estar unidas a histonas. MAR, región de unión a la matriz (Ward 2010).

La protección que aporta la unión de las protaminas a la cromatina espermática fue demostrada involuntariamente mediante un experimento en el que se sonicaba espermatozoos de ratón antes de ser microinyectado en ovocitos (Kuretake *et al.* 1996). La sonicación se utilizaba para separar las cabezas de los espermatozoides de las colas y después las cabezas eran inyectadas en ovocitos. Los ovocitos fecundados se desarrollaron en ratones vivos, indicando que la sonicación no dañó de manera significativa el ADN espermático. Este tratamiento llevado a cabo en células somáticas causa tal cantidad de roturas en la cromatina unida a histonas que las células no son capaces de sobrevivir. Este experimento apoya la hipótesis de que la presión evolutiva que dio como resultado esta manera de condensación, única en espermatozoides, era la protección del genoma paterno durante la fecundación (Ward 2010).

Es importante resaltar que las protaminas se encuentran sólo en espermatozoides maduros, no en cualquier otro tipo celular. Los otros dos tipos de dominios estructurales de la cromatina espermática, cromatina unida a histonas y MARs, se encuentran en células somáticas. Los toroides de protaminas son únicos en el espermatozoide maduro.

Otro aspecto importante de este gran dominio estructural de la cromatina espermática es que su principal función, casi con toda seguridad, la desempeña durante la fecundación, y no durante el desarrollo embrionario. La unión a protaminas también silencia la expresión génica durante la espermiogénesis (Balhorn 1982), pero su papel durante la fecundación es probablemente de protección. Hay varias evidencias que apoyan esta afirmación. Primero, las protaminas son reemplazadas completamente por histonas durante las primeras 2 - 4 h tras la fecundación, de manera que la cromatina paterna presenta la misma cromatina accesible que el resto de las células somáticas (Perreault & Zirkin 1982). Segundo, la cromatina espermática tiene una resistencia a la disrupción mecánica mucho mayor que las células somáticas (Kuretake *et al.* 1996). Finalmente, cuando se microinyectaron espermátidas redondas, el primer tipo de célula haploide que resulta de la espermiogénesis, en ovocitos de ratón, los ratones se desarrollaron de manera normal (Ogura *et al.* 1994). Como las espermátidas redondas no tienen protaminas, se puede concluir que este nivel de estructura de la cromatina espermática no se requiere para una correcta embriogénesis (Ward 2010).

La gran pregunta sin respuesta acerca de la estructura de la cromatina que se une a protaminas concierne a la organización secundaria. Mudrak *et al.* (2009) proporcionaron evidencias de que los toroides de protaminas se apilan unos al lado de otros (Figura 6B). Éste es un tema que todavía necesita investigación, sin embargo, desde un punto de vista funcional, la condensación de este ADN en toroides con estructura semicristalina ya infiere la característica funcional más importante del ADN espermático unido a protaminas, que es improbable que esté activo hasta después de la descondensación en el ovocito, y que proporciona una función protectora durante la fecundación.

Cromatina espermática unida a histonas

Dependiendo de la especie y del experimento utilizado para cuantificarla, entre un 2 y un 15% de la cromatina espermática de mamíferos se encuentra unida a histonas. Las histonas no se distribuyen al azar en el genoma espermático y se encuentran asociadas a secuencias de ADN específicas, que incluyen, los telómeros, promotores y regiones repetidas, y pequeñas regiones ricas en genes (Wykes & Krawetz 2003). Arpanahi *et al.* (2009) estudiaron el genoma espermático humano completo y concluyeron que las histonas se intercalan a través del genoma, principalmente en promotores génicos. En un estudio similar, llevado a cabo por otro grupo (Hammoud *et al.* 2009), se observó que en el espermatozoide humano todas las familias génicas que son importantes para el desarrollo temprano se encuentran asociadas preferencialmente a histonas. Estos datos sugieren que las histonas están presentes en dos tipos de distribución, en zonas del ADN relativamente largas, de 10 a 100 kb, y en zonas más cortas intercaladas a través del genoma (Figura 6B). Esto tiene importantes implicaciones para la organización estructural de la cromatina espermática, ya que si las histonas se distribuyen a intervalos regulares a través del genoma podrían formar parte de una unidad de repetición de la estructura de la cromatina espermática. Se ha propuesto que las regiones de unión entre cada toroide de protaminas de la fibra de cromatina están formadas por ADN unido a histonas, ya que estas zonas son las más sensibles a las nucleasas (Sotolongo *et al.* 2003) (Figura 6C).

Otra importante cuestión que concierne al ADN de la cromatina espermática que se encuentra unida a histonas es si las histonas espermáticas se transmiten al embrión en desarrollo. Poco después de la fecundación, las

protaminas de la cromatina espermática son reemplazadas por histonas proporcionadas por el ovocito, pero a día de hoy todavía no se sabe si las histonas presentes en la cromatina espermática también son reemplazadas o si permanecen formando parte de la cromatina paterna del cigoto. Se ha demostrado que histonas con modificaciones específicas presentes en la célula espermática también aparecen en el pronúcleo paterno, sugiriendo que nunca son reemplazadas. La transmisión de las histonas espermáticas y las estructuras cromatínicas asociadas sugiere que es posible que el ovocito recién fecundado herede la organización estructural de la cromatina basada en histonas del espermatozoide (van der Heijden *et al.* 2006; van der Heijden *et al.* 2008) (Figura 7).

Los datos que existen en la actualidad apoyan el modelo de que la cromatina asociada a histonas representa genes funcionales tanto para la espermiogénesis (representando posiblemente una cromatina activa residual que persiste a través de la condensación de la cromatina) (Martins & Krawetz 2005) como para el inicio de la fecundación (Arpanahi *et al.* 2009; Hammoud *et al.* 2009). Además, algunas de estas estructuras de cromatina asociada a histonas pueden persistir durante la reorganización estructural de la cromatina paterna, cuando el núcleo espermático se descondensa para formar el pronúcleo masculino (Ward 2010).

Regiones de unión a la matriz

Tanto en células somáticas como en el núcleo espermático, la cromatina se organiza en dominios formando bucles que se unen cada 20 - 120 kb de longitud a la matriz nuclear (Ward *et al.* 1989) (Figura 6A). La matriz nuclear de los espermatozoides de mamíferos es un entramado de fibras citoesqueléticas, cuya composición proteica y organización estructural todavía no ha sido completamente caracterizada. Algunos de los componentes de la matriz nuclear espermática podrían ser: TOP2B, actina, miosina, citoqueratinas y espectrina, y posiblemente transcriptasa inversa y la enzima multifuncional CAD, compuesta por carbamil fosfato sintetasa dependiente de glutamina, aspartato transcarbamilasa y dihidroorotasa (Shaman *et al.* 2007b). La matriz nuclear organiza la cromatina en bucles funcionales de ADN, que ayudan en la regulación de la replicación del ADN y en la transcripción génica (Vogelstein *et al.* 1980). Cada uno de estos bucles de ADN forma un toroide de protaminas (Figura 6A) y estos toroides se unen entre sí por un segmento de cromatina sensible a las nucleasas, el cual

es también el sitio de unión del ADN a la matriz nuclear, o MAR. La sensibilidad a las nucleasas de estas regiones de unión sugiere que en ellas el ADN se encuentra unido a histonas (Figura 6C). De esta manera, se sugiere un modelo de organización del ADN espermático en toroides de protaminas ancladas a la matriz nuclear (Ward 2010).

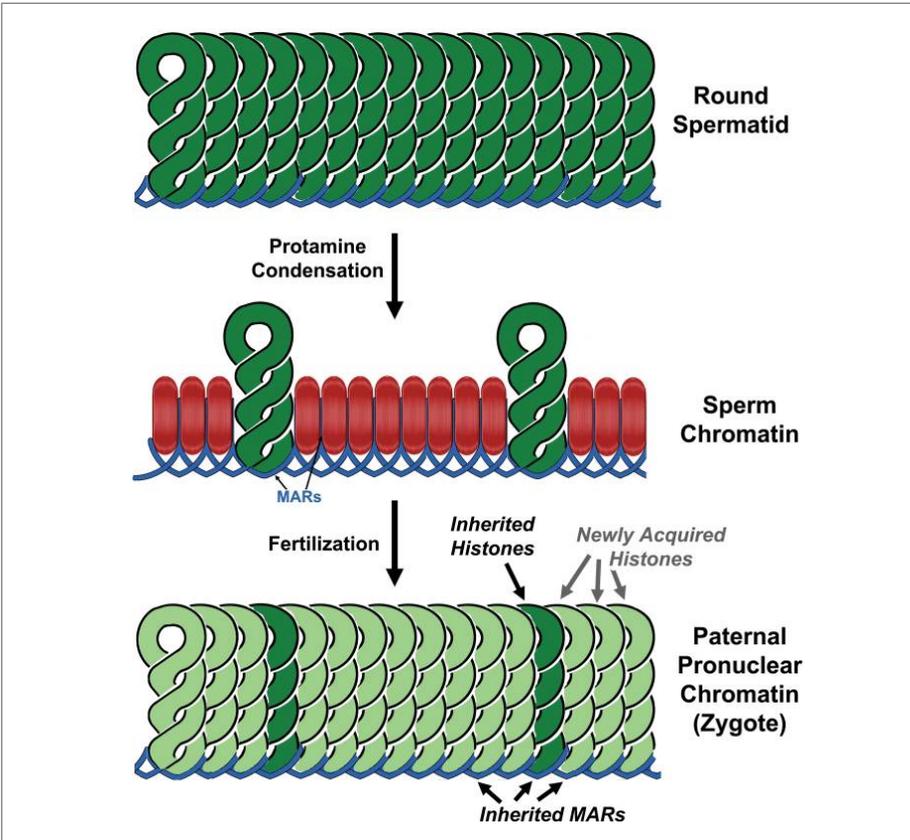


Figura 7. Herencia de los elementos estructurales de la cromatina espermática por el embrión. En espermatidas redondas el ADN se empaqueta por medio de histonas (arriba), pero durante la espermiogénesis la mayoría de las histonas son reemplazadas por protaminas (en medio, en rojo). Tras la fecundación, las protaminas son eliminadas y reemplazadas por histonas que proporciona el ovocito (abajo, en verde claro). Sin embargo, es probable que algunas histonas que fueron retenidas en el espermatozoide (en medio, en verde oscuro) sean retenidas tras la fecundación en el pronúcleo paterno. Las regiones de unión a la matriz nuclear espermática (MARs) probablemente también son retenidas en el pronúcleo paterno (Ward 2010).

Hay evidencias que indican que la matriz nuclear desempeña un papel en la función que realiza el genoma paterno durante el desarrollo temprano. Ward *et al.* (1999) demostraron que, al menos en ratones, no se producía

desarrollo embrionario tras inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) cuando se utilizaban espermatozoides con la matriz nuclear desestructurada. En una serie de experimentos llevados a cabo con el fin de averiguar cuáles eran los mínimos componentes del núcleo espermático necesarios para la formación del pronúcleo masculino y para la iniciación de la síntesis de ADN, Shaman *et al.* (2007a) demostraron que un núcleo espermático al que se le han eliminado las protaminas y las histonas es capaz de dar lugar a la formación del pronúcleo y de iniciar la síntesis de ADN, siempre que las MARs estén intactas. Y esto es así, incluso cuando más del 50% del ADN que no se encuentra unido a la matriz es eliminado mediante un tratamiento con endonucleasas de restricción (Figura 8). Cuando se inyectó en ovocitos el ADN solo, no se formaron los pronúcleos ni se produjo la replicación del ADN. Sin embargo, cuando se corta el ADN de las MARs, mediante TOP2B, se forman los pronúcleos, pero el ADN paterno se degrada tras la ICSI en el mismo momento en el que se inicia la síntesis del ADN materno (Yamauchi *et al.* 2007a; Yamauchi *et al.* 2007b). Cuando se inyectan ovocitos con núcleos espermáticos a los que se les han eliminado las protaminas y las histonas, no se produce el desarrollo al estado de blastocito, sugiriendo que, mientras que la organización del ADN en dominios en forma de bucle por medio de la matriz nuclear es requerida para la replicación del ADN, no es suficiente para el desarrollo (Ward 2010).

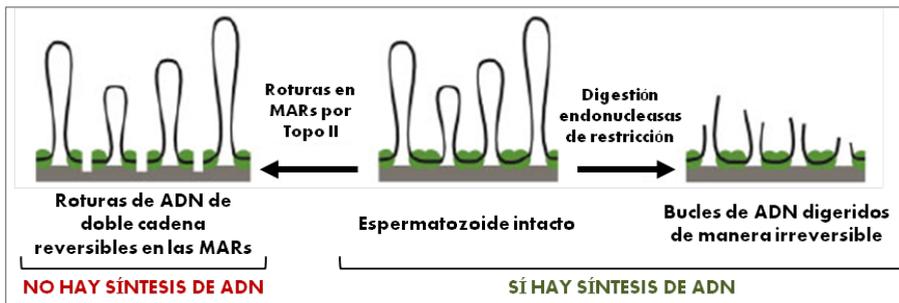


Figura 8. Comparación entre las roturas inducidas por la TOP2B endógena del núcleo espermático y las inducidas mediante tratamiento con endonucleasas de restricción exógenas. La TOP2B puede ser inducida para que produzca roturas en el ADN en las zonas por las que se une a la matriz. Estas roturas no eliminan secuencias de ADN y son reversibles. Cuando se inyectan en ovocitos espermatozoides con roturas inducidas por TOP2B, el pronúcleo paterno se forma, pero no hay replicación del ADN. Por el contrario, cuando se elimina una gran parte del ADN espermático mediante endonucleasas de restricción exógenas, el ADN paterno es capaz de replicarse tras la ICSI. Esto sugiere que, para que se inicie la síntesis de ADN, es más importante que las MARs estén intactas que la integridad del ADN en sí misma (Shaman *et al.* 2007a).

Estos datos sugieren dos cosas. Primero, que se requiere una adecuada asociación del ADN a la matriz nuclear para que se produzca la replicación del ADN del pronúcleo paterno (Figura 7) y, segundo, que la matriz nuclear espermática puede actuar como punto de control de la integridad del ADN espermático tras la fecundación (Ward 2010).

5. Fragmentación del ADN espermático.

El análisis del semen es la base de la evaluación del hombre infértil. El volumen y el pH del semen son indicadores del funcionamiento de la vesícula seminal y la próstata. La concentración espermática, la movilidad y la morfología dependen en gran medida de la función testicular y, en menor medida, de la función posttesticular (epidídimo) y del tracto genital (Jeyendran 2000). Aunque los hombres fértiles, como grupo, tienen de media unos valores más elevados de los parámetros seminales (concentración, movilidad y morfología) que los hombres infértiles, hay un solapamiento significativo entre estos dos grupos (Evenson *et al.* 1999).

En busca de nuevos marcadores que permitan discriminar mejor entre pacientes fértiles e infértiles y que sirvan para predecir los resultados en reproducción, surge el estudio de la integridad del ADN espermático. La fecundación implica la interacción directa entre el óvulo y el espermatozoide, la fusión de las membranas celulares y la unión de los genomas de los gametos masculino y femenino y, obviamente, la integridad del ADN y la cromatina espermáticos son esenciales para la correcta transmisión de la información genética a las siguientes generaciones. Hay multitud de evidencias que indican que anomalías en la cromatina o el daño en el ADN podrían influir en la infertilidad masculina humana y que los hombres infértiles tienen una mayor proporción de células espermáticas con el ADN fragmentado que los controles fértiles (Irvine *et al.* 2000; Saleh *et al.* 2002b; Zini & Libman 2006).

En las últimas décadas, ha aumentado el interés en el estudio de la calidad del ADN de las células germinales masculinas, especialmente debido al uso, cada vez más habitual, de técnicas de reproducción asistida. El uso de procedimientos, como la ICSI, que pasan por alto las barreras de la selección natural de espermatozoides para la fecundación, ha hecho que se tome conciencia de la posibilidad de transmisión de enfermedades genéticas.

Numerosos investigadores tratan de buscar respuestas al origen de la SDF, evalúan cuál de las técnicas disponibles es la más adecuada para el estudio de la integridad del ADN espermático y discuten acerca del impacto del daño en el ADN sobre la fertilidad masculina y los resultados en reproducción.

5.1. ¿Qué mecanismos inducen la fragmentación del ADN espermático?

La población de espermatozoides en el eyaculado puede ser muy heterogénea. Es muy habitual encontrar un cierto porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado y este porcentaje suele ser mayor en pacientes infértiles que en donantes fértiles. Todavía no se comprende bien el mecanismo molecular mediante el cual se produce la SDF, pero se han propuesto principalmente tres hipótesis para explicar cómo se originan estas roturas: 1) Anomalías en la remodelación de la cromatina espermática, 2) Estrés oxidativo y 3) Apoptosis.

Defectos en la remodelación de la cromatina espermática

El complejo proceso de intercambio de histonas por protaminas, que tiene lugar durante la espermiogénesis, requiere que se produzcan roturas a lo largo de la cadena de ADN para eliminar el estrés torsional que resulta de la eliminación de las histonas y la pérdida de los nucleosomas (McPherson & Longo 1992; Sakkas *et al.* 1995; Levesque *et al.* 1998; Kierszenbaum 2001; Meyer-Ficca *et al.* 2005). Es necesario que este proceso sea regulado de manera estricta para asegurar que todas las roturas sean reparadas de manera correcta (Meyer-Ficca *et al.* 2005; Meyer-Ficca *et al.* 2011). Varios autores han postulado que si la espermatogénesis se ve alterada por cualquier razón, las roturas creadas para eliminar el estrés torsional podrían quedar sin reparar y el espermatozoide, carente de capacidad de reparación por sí mismo, sería liberado del epitelio germinal llevando estas roturas en el ADN (Ward & Coffey 1991; Sakkas *et al.* 1999; Agarwal & Said 2003). Hay experimentos que demuestran el potencial que poseen estos mecanismos de reparación, cuando se ven alterados, para generar espermatozoides que portan elevadas frecuencias de roturas en el ADN. Por ejemplo, los ratones

knockout para las enzimas implicadas en el ciclo de PAR (PARP1 y PARG) muestran roturas en la cadena de ADN que se asocian con varios grados de subfertilidad (Meyer-Ficca *et al.* 2009). De manera similar, se cree que las proteínas de transición, que sustituyen a las histonas durante la espermiogénesis antes de que las protaminas se unan al ADN espermático, juegan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad del ADN espermático. Se ha demostrado que los ratones que carecen de proteínas de transición generan espermatozoides con bajo potencial de fecundación, compactación de la cromatina defectuosa y altos niveles de SDF (Zhao *et al.* 2004).

Existen abundantes evidencias que asocian el daño en el ADN espermático con un fallo en la espermiogénesis, como se demostró en estudios en los que se empleaba el colorante fluorescente Cromomicina A₃ (CMA₃). Este colorante se une al ADN espermático en los lugares normalmente ocupados por las protaminas; como resultado, la cantidad de colorante unido al ADN espermático se correlaciona negativamente con la eficiencia de la protaminación durante la espermatogénesis. Se han publicado varios estudios en los que se ha demostrado, utilizando esta técnica, que existe una excelente correlación entre la SDF y un posible defecto en la remodelación de la cromatina durante la espermatogénesis (Bianchi *et al.* 1993; Nasr-Esfahani *et al.* 2005; De Iuliis *et al.* 2009; Tavalaei *et al.* 2009).

Estrés oxidativo

La segunda hipótesis propone que la SDF podría ser consecuencia del estrés oxidativo en el tracto reproductivo masculino. El estrés oxidativo celular es una consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los mecanismos de defensa antioxidantes que posee la célula. Puede surgir como consecuencia de una elevada producción de oxidantes por parte de la célula o debido a que la célula posee niveles bajos de moléculas antioxidantes, tanto enzimáticas como no enzimáticas (de Lamirande & Gagnon 1995). Las ROS son agentes oxidantes generados como resultado del metabolismo del oxígeno. El término ROS engloba una amplia categoría de moléculas que incluye radicales (moléculas altamente inestables por poseer un electrón desapareado) y no radicales. Pueden oxidar rápidamente otras biomoléculas cercanas ejerciendo una influencia, positiva o negativa, sobre su función celular normal. Entre las ROS se encuentran el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el peróxido de

hidrógeno (H_2O_2). Las especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico (NO^*) y el peroxinitrito ($ONOO^*$), también son consideradas una subclase de ROS (Darley-Usmar *et al.* 1995).

Cuando las células germinales masculinas se están diferenciando en los testículos, son muy sensibles al estrés oxidativo y dependen en gran medida de la protección que ofrecen las células de Sertoli, las cuales poseen altos niveles de actividad superóxido dismutasa (SOD), así como actividad reductasa, transferasa y peroxidasa del ciclo del glutatión. Una vez los espermatozoides son liberados del epitelio germinal, ya no pueden beneficiarse de la capacidad defensora de las células de Sertoli y, como células aisladas, los espermatozoides son muy vulnerables al ataque oxidativo. Una de las razones por las que los espermatozoides de mamíferos son tan vulnerables al estrés oxidativo es que, justo antes de ser liberados del epitelio germinal, se despojan de la mayoría de su citoplasma, en el cual se encuentran la mayoría de las enzimas antioxidantes que protegen a las células del estrés oxidativo. Debido a esta carencia de protección intrínseca contra el estrés oxidativo, estas células son muy dependientes de las propiedades antioxidantes del líquido seminal en el que se encuentran. Es por esta razón que el líquido seminal es uno de los medios antioxidantes más poderosos que se conocen y contiene varias formas muy especializadas de enzimas antioxidantes, incluyendo formas únicas de glutatión peroxidasa (GPx5) y SOD extracelular, así como una serie de antioxidantes de pequeña masa molecular, como ácido úrico, vitamina C, tirosina y polifenoles (Aitken & Curry 2011).

A pesar de su inherente vulnerabilidad al ataque oxidativo, los espermatozoides también generan ROS. El propósito de la generación de estas ROS parece ser la regulación de procesos biológicos críticos, conocidos como capacitación, sin los cuales la fecundación es imposible. Los espermatozoides de mamíferos son eyaculados en un estado inmaduro, sin capacidad para fecundar. Sin embargo, cuando estas células ascienden por el tracto reproductivo femenino, son transformadas fisiológicamente mediante el proceso de capacitación, de manera que se vuelven competentes para reconocer al ovocito e iniciar la compleja cascada de interacciones celulares que resultan en la fecundación. Una vez capacitados, los espermatozoides son capaces de unirse a la zona pelúcida del ovocito. Hay muchas evidencias que sugieren que el espermatozoide necesita pequeñas cantidades de ROS para que la capacitación, la hiperactivación y la reacción acrosómica tengan lugar (de Lamirande & Gagnon 1995; de Lamirande *et al.* 1997). Sin embargo,

las ROS deben ser continuamente inactivadas para mantener sólo esa pequeña cantidad necesaria para preservar la función celular.

Una excesiva generación de ROS en el semen puede causar modificaciones químicas en el ADN espermático nuclear, así como dañar las proteínas y lípidos de las membranas plasmática y mitocondrial. La membrana plasmática espermática es particularmente vulnerable al estrés oxidativo, ya que es muy rica en ácidos grasos polinsaturados, los cuales son muy sensibles a la oxidación y a otras modificaciones químicas y estructurales (Jones *et al.* 1979). Las ROS modifican la membrana plasmática del espermatozoide alterando su fluidez. Esto da lugar a una pérdida de la motilidad y afecta a los eventos de fusión de la membrana, como la reacción acrosómica y la fusión espermatozoide-ovocito (Aitken *et al.* 1989a). También se ha demostrado que las ROS causan daño en el ADN espermático, tanto nuclear como mitocondrial (Sawyer *et al.* 2003). El ADN mitocondrial es el más vulnerable al ataque de ROS y un marcador muy sensible al estrés oxidativo en la línea germinal. Sin embargo, como este ADN es destruido lentamente tras la fecundación, su integridad no tendrá muchas consecuencias, tanto para la funcionalidad del espermatozoide como para la normalidad del embrión resultante (Aitken & Curry 2011).

Debido a la abundancia y diversidad de las ROS, el tipo de daño que producen en el ADN es también muy diverso. Los principales tipos de lesiones producidas en el ADN espermático debido a daño oxidativo son: (1) roturas de ADN de cadena sencilla o de cadena doble, (2) pérdida de una base para dar lugar a un sitio abásico, (3) modificación química de las bases, por ejemplo, oxidación o alquilación, (4) entrecruzamientos del ADN entre o intra-cadena y (5) entrecruzamientos ADN-proteína (Gharagozloo & Aitken 2011). Una de las modificaciones del ADN más frecuentes es la hidroxilación de la guanina en el carbono 8 para dar lugar a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina (8-oxoguanina o 8-oxoG) (Figura 9), la cual es considerada como un marcador de daño oxidativo (Breen & Murphy 1995; Kasai 1997).

Las principales fuentes de ROS en el plasma seminal son los leucocitos (Aitken *et al.* 1994; Aitken & Baker 1995) y los espermatozoides inmaduros (Gómez *et al.* 1996). Las muestras de semen pueden estar contaminadas con leucocitos, principalmente neutrófilos y macrófagos. Los neutrófilos activados generan grandes cantidades de ROS, particularmente $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Gharagozloo & Aitken 2011). Por otro lado, los espermatozoides inmaduros

que contienen gotas citoplasmáticas o un exceso de citoplasma residual, como resultado de un fallo en la espermiogénesis, también generan grandes cantidades de ROS (Gómez *et al.* 1996).

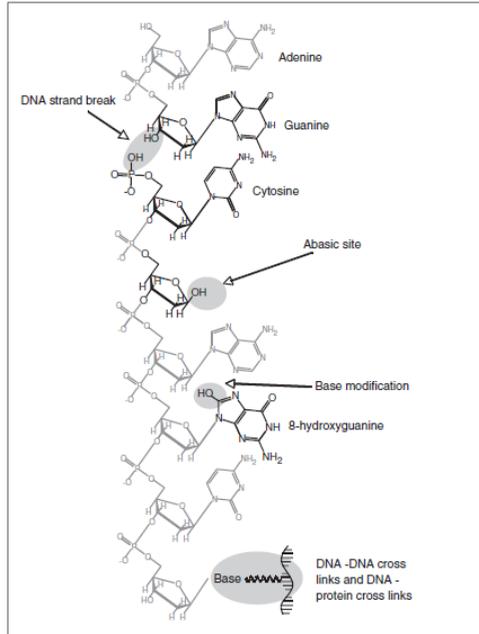


Figura 9. Tipos de lesiones que podrían aparecer en el ADN de un espermatozoide humano a consecuencia del daño oxidativo (Aitken *et al.* 2009).

Numerosos autores han publicado que existe un aumento significativo en la actividad de las ROS en los espermatozoides humanos en varios tipos de infertilidad (Aitken & Clarkson 1987; Aitken *et al.* 1989b; D'Agata *et al.* 1990; Aitken *et al.* 1991; Aitken *et al.* 1992; Iwasaki & Gagnon 1992; Zini *et al.* 1993; de Lamirande & Gagnon 1995; Sharma & Agarwal 1996; Kodama *et al.* 1997; Shen *et al.* 1999). Y es ampliamente, si no universalmente, aceptado que el exceso de ROS contribuye significativamente al daño en el ADN espermático y a la peroxidación lipídica (Álvarez *et al.* 1987; Hughes *et al.* 1996; Aitken & De Iulii 2010; Aitken *et al.* 2010; Gharagozloo & Aitken 2011). No hay demasiados estudios que hayan examinado el daño en el ADN nuclear de espermatozoides humanos en busca de pruebas de su origen. Estos estudios han revelado que la 8-oxoG es una modificación habitual en las bases del ADN del espermatozoide humano y han llevado a estos autores a concluir

que el daño oxidativo parece ser el mayor contribuyente al daño observado en la línea germinal masculina (Moustafa *et al.* 2004; De Iuliis *et al.* 2009; Thomson *et al.* 2011).

Apoptosis

La apoptosis es un modo de muerte celular programada, activa, basada en un mecanismo genético que induce una serie de alteraciones celulares, morfológicas y bioquímicas, que llevan a la célula al suicidio (Nagata 1997). Este proceso generalmente tiene lugar en momentos específicos del desarrollo embrionario normal para que los tejidos adquieran su forma definitiva y durante la vida adulta para descartar células envejecidas, que han perdido su función o que la tienen alterada (Vaux & Korsmeyer 1999). En los testículos de mamíferos, las células germinales, antes de diferenciarse en espermatozoides maduros, se expanden de manera clonal a través de varios ciclos de mitosis. Esta proliferación mitótica es excesiva y requiere de un mecanismo de tipo apoptótico para ajustar el número de células germinales que las células de Sertoli pueden soportar (Sinha Hikim & Swerdloff 1999). De esta manera, en el contexto de la reproducción masculina, la apoptosis controlaría la sobreproducción de gametos masculinos y restringiría los niveles de proliferación normales en condiciones desfavorables para el desarrollo espermático (Agarwal & Said 2003). La tercera hipótesis acerca del origen del daño en el ADN de los espermatozoides humanos sugiere que este daño es el resultado de un mecanismo apoptótico que se inicia al principio de la espermatogénesis, pero que no se puede completar debido a que la extrema remodelación de la cromatina, que sufren las células germinales durante la espermiogénesis, elimina la maquinaria intracelular necesaria para llevar a cabo la muerte celular (Sakkas *et al.* 2002).

El hecho de que los espermatozoides sean células transcripcional y traduccionalmente inactivas significa que no pueden llevar a cabo un mecanismo apoptótico convencional. Además, se ha observado que muchos de los reactivos que inducen apoptosis en células somáticas no son efectivos en espermatozoides (Aitken & Koppers 2011). Sin embargo, hay numerosas publicaciones que demuestran que estas células pueden exhibir muchas de las características de la apoptosis, incluyendo activación de caspasas 1, 3, 8 y 9; externalización de fosfatidil serina y generación mitocondrial de ROS (Barroso *et al.* 2000; Paasch *et al.* 2004; Grunewald *et al.* 2009).

Esta teoría ha sido bastante controvertida, ya que, aunque la presencia de estos marcadores apoptóticos en espermatozoides maduros, particularmente frecuentes en hombres infértiles, se asocia con una pérdida de la función del espermatozoide (Zhang *et al.* 2008), no parece correlacionarse con la presencia de SDF (Muratori *et al.* 2000; Sakkas *et al.* 2002; McVicar *et al.* 2004; Moustafa *et al.* 2004; Paasch *et al.* 2004).

Recientemente, Koppers *et al.* (2011) han proporcionado evidencias de que se puede inducir una apoptosis atípica en el espermatozoide humano maduro. Esta forma limitada de apoptosis se caracteriza por la generación mitocondrial de ROS, la externalización de fosfatidil serina, la activación de caspasas, la pérdida de movilidad del espermatozoide, la formación de vacuolas en el citoplasma y la aparición de daño oxidativo en el ADN. En células somáticas, tras la inducción de la apoptosis, se produce la activación de las endonucleasas, que posteriormente se mueven al núcleo de la célula para producir la fragmentación del ADN. En espermatozoides, sin embargo, aunque las endonucleasas pudieran ser liberadas de la mitocondria (ENDO G [endonucleasa G] y AIFM [factor de inducción de la apoptosis, asociado a las mitocondrias]) o activadas en el citosol (CAD [DNasa activada por caspasas]) durante la apoptosis, la arquitectura física del espermatozoide evitaría la traslocación de éstas al núcleo. Esta limitación se debe principalmente a dos factores: primero, el denso empaquetamiento de la cromatina impediría que estas proteínas penetrasen en su estructura interna; segundo, la mitocondria y la mayoría del citoplasma están localizados en la pieza media, mientras que la cromatina se localiza en la cabeza del espermatozoide. Como consecuencia, la SDF no se produciría de manera inmediata por la acción de las endonucleasas, sino que sería inducida de manera secundaria como resultado de la formación de daño oxidativo en el ADN. Ellos proponen que este mecanismo sería una respuesta fisiológica adaptativa al estrés oxidativo, más que un evento mediado por un receptor. Esta respuesta apoptótica tendría dos propósitos: por un lado, la externalización de fosfatidil serina podría facilitar la fagocitosis de los espermatozoides senescentes moribundos en el tracto femenino, sin que se produzca una reacción inflamatoria; y por otro, la pérdida de movilidad evitaría que aquellos espermatozoides que portan daño oxidativo participen en el proceso de fecundación (Aitken & Koppers 2011; Koppers *et al.* 2011).

Las tres hipótesis que se exponen para explicar el origen del daño en el ADN espermático no tienen por qué ser excluyentes y cada uno de estos mecanismos podría contribuir en mayor o menor medida al daño en el ADN

observado en muestras espermáticas, pudiendo haber variaciones entre individuos e incluso dentro de un mismo individuo entre diferentes momentos, dependiendo de las circunstancias que afecten a la espermatogénesis. Las evidencias disponibles sugieren que la mayoría del daño en el ADN es oxidativo (Moustafa *et al.* 2004; De Iuliis *et al.* 2009) y que se asocia con defectos en la espermiogénesis (Bianchi *et al.* 1993; De Iuliis *et al.* 2009) y con un aumento de la generación de ROS por parte de los espermatozoides (Aitken & Clarkson 1987; Shen *et al.* 1999). Esto ha llevado a Aitken *et al.* (2009) a formular una hipótesis, a la que denominan “hipótesis de dos pasos”, que relaciona la eficiencia de la remodelación de la cromatina, el daño oxidativo en las bases del ADN espermático y la SDF (Figura 10). Según esta hipótesis, el estado patológico de los espermatozoides se iniciaría debido al estrés oxidativo en los testículos, como resultado de factores como la edad, torsión testicular, varicocele, exposición a tóxicos, a radiación electromagnética, etc. Durante la espermatogénesis, no existe transcripción génica y, como consecuencia, este proceso es conducido mediante la traducción de ARNm preexistente. El estrés oxidativo interfiere con la actividad de la enzima aminoacil-ARNt sintetasa, reduciendo la fidelidad de la traducción de ARNm (Ling & Soll 2010). Esto hace de la espermiogénesis un proceso muy susceptible al daño oxidativo. La alteración en la diferenciación de las células germinales daría lugar a espermatozoides que podrían sufrir tres tipos de defectos: (1) espermatozoides cuyo ADN todavía mantendría las roturas introducidas por la topoisomerasa durante las primeras etapas de la espermiogénesis para aliviar el estrés torsional asociado con la compactación del ADN, (2) espermatozoides cuyo ADN está mal compactado debido a una carencia de protaminación y, por esta razón, es vulnerable al ataque oxidativo, y (3) espermatozoides que debido a la mala compactación tienden a entrar prematuramente en un estado de senescencia programada (apoptosis), la cual implica la generación de ROS por parte de la mitocondria. Como consecuencia de (2) y (3) se produce daño oxidativo en el ADN nuclear que da lugar a la creación de sitios abásicos, modificaciones en las bases del ADN (como 8-oxoG) y SDF (Aitken *et al.* 2009; De Iuliis *et al.* 2009; Aitken & De Iuliis 2010; Aitken & Curry 2011; Aitken & Koppers 2011; Koppers *et al.* 2011).

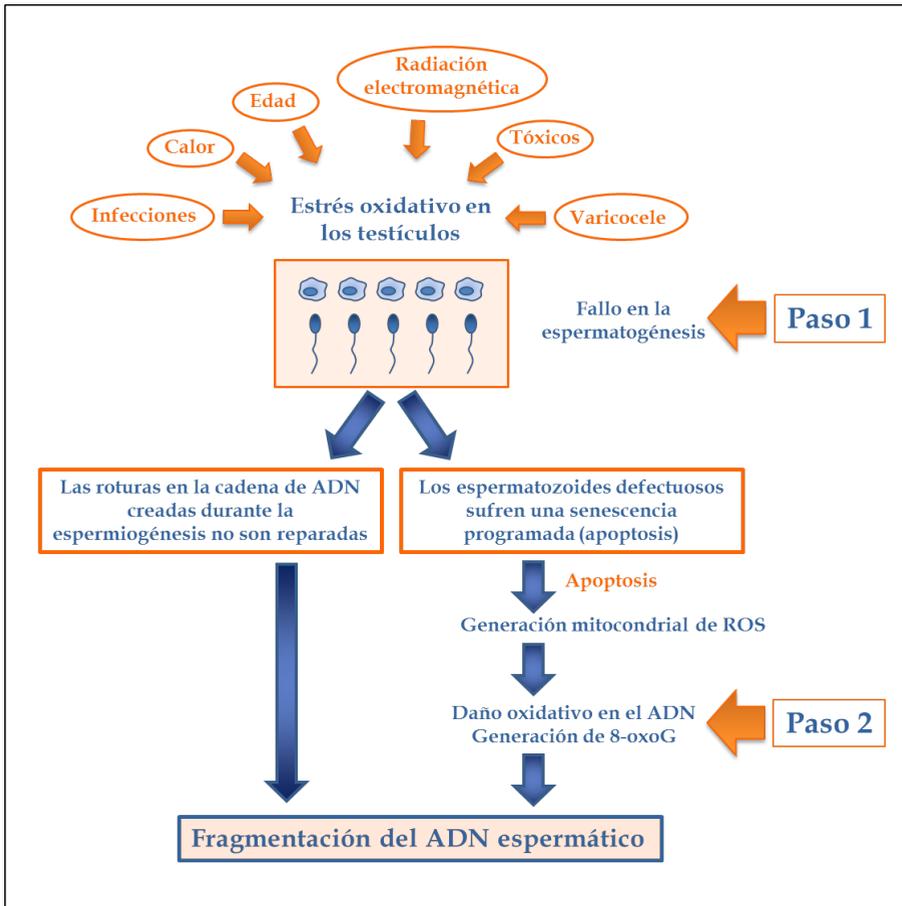


Figura 10. Hipótesis de dos pasos para explicar el origen del daño en el ADN de la línea germinal (Aitken & Curry 2011).

5.2. Técnicas para la evaluación del daño en el ADN espermático.

Tras más de 30 años utilizando diferentes técnicas para estudiar la SDF, la comunidad científica todavía tiene serias dudas acerca de qué técnica produce resultados más fiables y, lo que es más importante, qué valor tienen estos resultados en un contexto clínico (Shamsi *et al.* 2011; Zini 2011). Actualmente hay varias técnicas para detectar la SDF de manera efectiva. Estas técnicas se pueden clasificar principalmente en dos grupos. El primer grupo incluye aquellas técnicas en las que la SDF se mide por medio de enzimas que marcan el ADN en los lugares donde hay roturas. El segundo

grupo incluye las técnicas que utilizan la propiedad que tiene el ADN fragmentado para desnaturalizarse fácilmente bajo ciertas condiciones. Por último, existen otras técnicas, menos utilizadas, que aprovechan las propiedades de ciertos colorantes para estudiar la integridad del ADN espermático.

Técnicas basadas en el marcaje enzimático de las roturas de ADN

TUNEL (marcaje del extremo libre por dUTP mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal)

La técnica de TUNEL (del inglés, *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling*) se basa en el marcaje enzimático de las roturas del ADN, ya sean de cadena sencilla o de cadena doble, por medio de una reacción catalizada por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). La enzima TdT no necesita molde e incorpora desoxiuridina trifosfato (dUTP) marcada con biotina a los extremos 3'-OH libres de la cadena de ADN. Estos nucleótidos se detectan tras una reacción con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo y, de esta manera, se crea una señal, que será mayor cuanto mayor sea el número de roturas en el ADN. Las roturas se pueden cuantificar mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia (Gorczyca *et al.* 1993a; Gorczyca *et al.* 1993b).

Esta técnica se comercializa en forma de kit, pero tiene ciertas desventajas para su uso en la rutina clínica, como el hecho de necesitar un equipo sofisticado y muy costoso, o el requerir personal especializado. Además, el protocolo de TUNEL que se utiliza en la mayoría de los laboratorios ha sido diseñado para trabajar con ADN de células somáticas, donde la cromatina se organiza con histonas. Este protocolo podría no ser tan efectivo cuando se usa para trabajar con ADN de espermatozoides, que está altamente compactado debido a su organización con protaminas, dado que las enzimas utilizadas en este ensayo son moléculas de gran tamaño que podrían no alcanzar de la misma manera todas las dianas del ADN. Por otro lado, el sustrato para la enzima transferasa terminal debe ser un extremo 3'-OH libre que no haya sido modificado químicamente y, por este motivo, el ensayo de TUNEL puede subestimar la cantidad de daño en el ADN. Por último, también se han observado diferencias en los niveles de SDF dependiendo de si los resultados del ensayo se estudian por citometría de flujo o por microscopía (Domínguez-Fandos *et al.* 2007).

ISNT (marcaje por traslado de mella)

La técnica de ISNT (del inglés, *in situ nick translation*) cuantifica la incorporación de dUTP biotinilada a roturas del ADN de cadena sencilla, en una reacción catalizada por la enzima ADN polimerasa I. Esta técnica es muy similar a la de TUNEL, pero, en este caso, la enzima polimerasa I, a diferencia de la transferasa terminal, necesita una cadena molde y tiene actividad exonucleasa, con lo cual la incorporación de nucleótidos es mayor (Gorczyca *et al.* 1993a; Gorczyca *et al.* 1993b). Las ventajas y desventajas de esta técnica son las mismas que las del TUNEL.

Técnicas basadas en la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización*Ensayo del cometa o SCGE (electroforesis en gel de células aisladas)*

El ensayo del cometa o técnica de SCGE (del inglés, *single cell gel electrophoresis*) fue descrito por primera vez por Ostling y Johanson (1984) y se basa en la resistencia diferencial que ofrecen las moléculas de ADN de distintos tamaños cuando se mueven a través de un gel. Realizando la electroforesis bajo condiciones neutras, se demostró que la migración de los bucles de ADN de doble cadena del núcleo desproteínizado de una célula dañada, formando una imagen similar a la de la cola de un cometa, era proporcional a la cantidad de roturas de doble cadena que tenía la célula. Singh *et al.* (1989) consiguieron aumentar la sensibilidad de la técnica empleando condiciones alcalinas antes y durante la electroforesis, ya que así se pueden detectar roturas de cadena sencilla, roturas de doble cadena y lugares lábiles alcalinos. Posteriormente, Rivero *et al.* (2003) introdujeron otra variante de la técnica, la SCGE bidimensional, que permite diferenciar las roturas de cadena sencilla de las roturas de doble cadena. Para esto, se realizan dos electroforesis secuenciales; la primera, en condiciones neutras, reflejaría las roturas de doble cadena y la segunda, en condiciones alcalinas, permitiría ver las roturas de cadena sencilla (Figura 11). El daño se cuantifica, mediante microscopía de fluorescencia, midiendo el desplazamiento del material genético desde el núcleo (“cabeza del cometa”) hasta el final de la cola. Las longitudes de las colas se utilizan como un índice del daño. Otro parámetro utilizado para cuantificar el daño es el “momento de la cola”, que es el producto de la longitud de la cola por la intensidad (fracción total de ADN que hay en la cola). Estas medidas pueden

ser realizadas tanto de manera manual como utilizando un programa de análisis de imagen.

Este ensayo se aplica principalmente en investigación, puesto que la metodología es compleja y laboriosa y requiere tiempo y personal especializado. Además, el equipo técnico requerido no suele estar presente en los laboratorios de andrología.

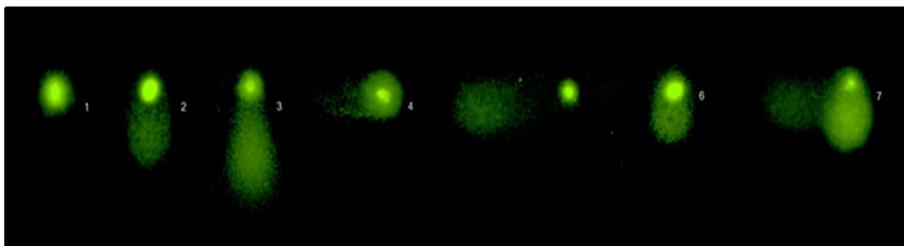


Figura 11. Espermatozoides obtenidos con el ensayo del cometa en dos dimensiones (2D), teñidos con Sybr green: (1) espermatozoide sin roturas; (2) espermatozoide con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena sencilla; (3) espermatozoide con un nivel alto de roturas de ADN de cadena sencilla; (4) espermatozoide con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena doble; (5) espermatozoide con un nivel alto de roturas de ADN de cadena doble; (6) espermatozoide con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena sencilla y doble; (7) espermatozoide con un nivel alto de roturas de ADN de cadena sencilla y doble (Enciso *et al.* 2009).

DBD-FISH (detección de roturas en el ADN por hibridación in situ fluorescente)

La técnica de DBD-FISH (del inglés, *DNA Breakage Detection - Fluorescence in situ Hybridization*), desarrollada por Fernández *et al.* (1998), permite detectar y cuantificar las roturas del ADN *in situ*, célula a célula, en el genoma global o en secuencias específicas.

Las células, incluidas en un microgel de agarosa, se someten a una desnaturalización suave del ADN y se eliminan las proteínas mediante una solución de lisis. Las soluciones de desnaturalización empleadas, de naturaleza alcalina o ácida, generan tramos de ADN de cadena sencilla a partir de los extremos de las roturas de doble cadena o de cadena sencilla, así como lugares sensibles al álcali. Estas regiones actúan como diana para la hibridación de sondas, de manera que a mayor cantidad de roturas, se generará mayor cantidad de ADN de cadena sencilla que hibridará con la sonda. La intensidad de la señal emitida por la sonda, marcada con un

fluorocromo, será proporcional a la cantidad de roturas. La cuantificación de la señal se realiza mediante un programa de análisis de imagen (Figura 12).

Esta técnica también se emplea básicamente en investigación, y es de gran interés puesto que permite evaluar el daño célula a célula, *in situ*, en secuencias específicas de ADN.

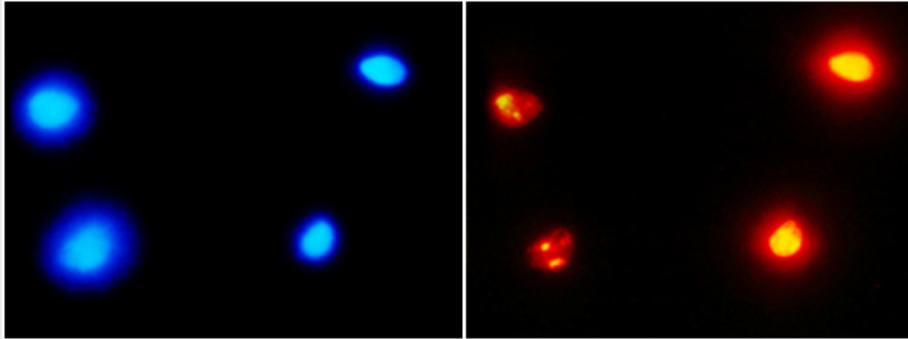


Figura 12. DBD-FISH en espermatozoides humanos. (izquierda) espermatozoides humanos teñidos con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol); (derecha) espermatozoides humanos tras DBD-FISH con sonda de genoma total (Fernández *et al.* 2000).

SCSA (*ensayo de la estructura de la cromatina espermática*)

El SCSA (del inglés, *sperm chromatin structure assay*) se basa en el hecho de que la cromatina espermática con algún tipo de anomalía presenta una mayor susceptibilidad a la desnaturalización parcial del ADN *in situ*, tras aplicar un tratamiento con calor o una solución ácida. La extensión de la desnaturalización del ADN, tras el tratamiento ácido o con calor, se determina utilizando el colorante metacromático naranja de acridina (AO). El AO emite fluorescencia verde cuando se intercala en el ADN de doble cadena (ADN intacto), mientras que, cuando se intercala en ADN de cadena sencilla (ADN fragmentado) emite fluorescencia roja. Este protocolo ha sido dividido en SCSA_{ÁCIDO} y SCSA_{CALOR} para diferenciar los medios físicos utilizados para inducir la desnaturalización del ADN. Ambos métodos dan prácticamente los mismos resultados, pero el SCSA_{ÁCIDO} es mucho más sencillo (Evenson *et al.* 1980).

El SCSA, desarrollado hace más de 30 años, se considera actualmente como la técnica de referencia para el análisis de la SDF. Existe mucha investigación, tanto básica como clínica, que demuestra que el SCSA es una

técnica muy potente. Los estudios realizados empleando esta técnica indican que valores del test SCSA, expresados en DFI (índice de fragmentación de ADN), se correlacionan significativamente con los índices de embarazo *in vivo* e *in vitro*. Además, se ha establecido un umbral de DFI que identifica muestras compatibles con el embarazo (< 30%) (Larson *et al.* 2000; Evenson *et al.* 2002; Evenson & Wixon 2006b; Bungum *et al.* 2007). La desventaja de esta técnica es que requiere un citómetro de flujo y técnicos altamente especializados.

Naranja de Acridina (AO)

Algunos investigadores han utilizado las propiedades de este colorante, aplicando el mismo principio que para la técnica de SCSA, para visualizar los espermatozoides con el ADN fragmentado empleando microscopía de fluorescencia en vez de un citómetro de flujo (Tejada *et al.* 1984). El principal problema de esta técnica consiste en la subjetividad del observador a la hora de discriminar entre la emisión de la fluorescencia verde y roja, puesto que existen una gran cantidad de niveles intermedios de coloración, probablemente debidos a la sensibilidad diferencial de las poblaciones espermáticas a la desnaturalización. Por otra parte, los resultados parecen ser poco reproducibles (Evenson & Wixon 2006b).

Test SCD (test de dispersión de la cromatina espermática)

El test SCD (del inglés, *sperm chromatin dispersion*), desarrollado por Fernández *et al.* (2003) y la versión mejorada de esta técnica, el kit Halosperm® (Fernández *et al.* 2005b; Fernández *et al.* 2005a), es un método rápido, basado en una desnaturalización controlada del ADN seguida de la eliminación de proteínas, para determinar la SDF.

Las bases técnicas del test SCD se apoyan en dos observaciones: la primera es que las cadenas de ADN que tienen roturas o mellas se desnaturalizan más fácilmente porque los extremos de las roturas se comportan como puntos de origen en la desnaturalización. Ésta es la base de otros ensayos clásicos que se han empleado durante muchos años para la cuantificación de roturas en el ADN, en radiobiología y mutagénesis (Ahnstrom & Erixon 1973). La segunda es que la eliminación parcial de las proteínas de la

cromatina da lugar a un halo de dispersión de bucles de ADN, que permanece unido a residuos de proteína, como describieron Cook y Brazell (1975).

La metodología del test SCD consta de tres pasos principales: 1) Inclusión de las células espermáticas en una matriz inerte de agarosa que se extiende sobre un portaobjetos; 2) Incubación de la muestra en HCl para la desnaturalización ácida; 3) Incubación en una solución de lisis para eliminar parcialmente las proteínas nucleares; y un último paso de tinción. La solución ácida produce una desnaturalización controlada del ADN, esto es, sólo se desnaturalizarán aquellas zonas que tengan roturas. La incubación posterior en la solución de lisis elimina las protaminas. Si el ADN espermático está intacto, se forma un característico halo de bucles de ADN alrededor de un denso core central. Por el contrario, si el núcleo espermático contiene ADN fragmentado, los halos están ausentes o son muy pequeños. Este comportamiento diferencial de la cromatina es la base del test SCD y se puede valorar utilizando tanto microscopio de campo claro como microscopio de fluorescencia (Figura 13).

El test SCD tiene la valiosa ventaja de que puede ser validado directamente por otras técnicas aplicadas sobre la misma célula espermática. De esta manera, aplicando la técnica de DBD-FISH sobre muestras que habían sido procesadas con el test SCD, se demostró *in situ* que sólo aquellos nucleoides que presentaban halo pequeño o que no presentaban halo contenían el ADN fragmentado. La incubación con la solución ácida que se lleva a cabo cuando se realiza el test SCD deja al descubierto los extremos de ADN desnaturalizados, de cadena sencilla, con lo cual la incubación con una sonda de genoma total tras realizar el test SCD fue suficiente para observar que sólo estos espermatozoides que no tenían halo o que tenían halo pequeño daban lugar a una fuerte señal de hibridación. Esto permitió establecer cinco patrones de clasificación (Figura 14): (1) espermatozoides de halo grande: aquellos cuya anchura de halo es igual o mayor que el menor diámetro del core; (2) espermatozoides de halo mediano: la anchura de su halo está entre los de halo grande y los de halo pequeño; (3) espermatozoides de halo pequeño: con un halo de anchura similar o menor a un tercio del diámetro del core; (4) espermatozoides sin halo; y (5) espermatozoides sin halo y degradados: similares a (4) pero con una tinción más suave y/o irregular. El porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado en una muestra sería igual a la suma de los porcentajes de (3) + (4) + (5).

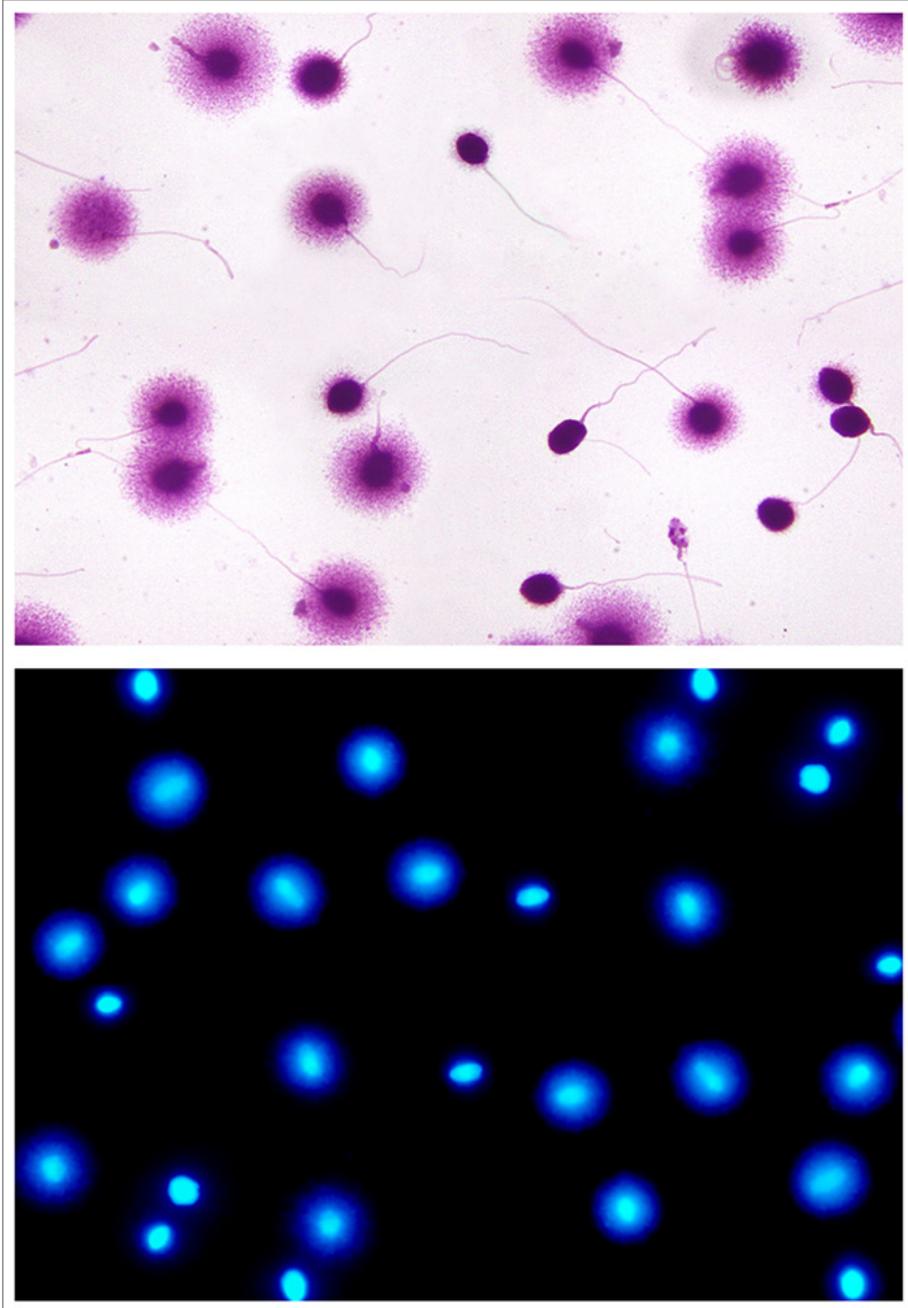


Figura 13. Nucleoides de espermatozoides humanos obtenidos con el test SCD. (arriba) Tinción Wright para microscopio de campo claro. (abajo) Tinción DAPI para microscopio de fluorescencia.

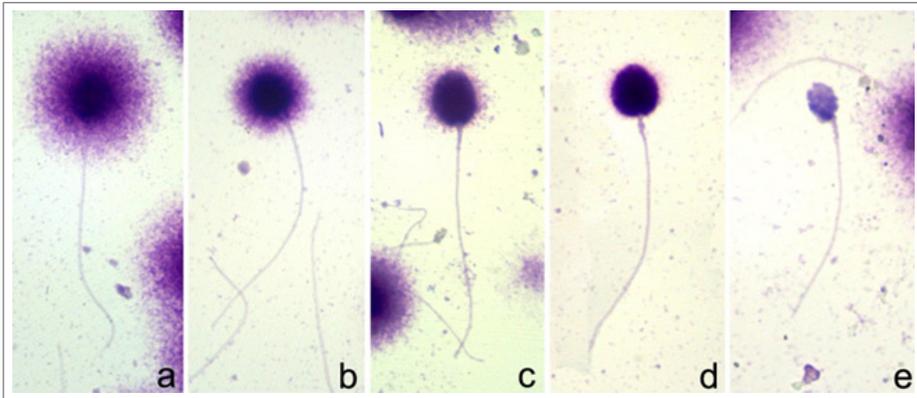


Figura 14. Espermatozoides humanos procesados mediante el test SCD y teñidos con Wright para microscopio de campo claro. (a) Nucleoide de halo grande. (b) Nucleoide de halo mediano. (c) Nucleoide de halo pequeño. (d) Nucleoide sin halo. (e) Nucleoide sin halo, degradado. (c), (d) y (e) contienen ADN fragmentado.

El test SCD también fue validado de manera indirecta comparando los resultados con los obtenidos utilizando otras técnicas, utilizando alícuotas de la misma muestra espermática. El porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado se midió con TUNEL y SCSA y la correlación entre los resultados obtenidos con estas dos técnicas y los obtenidos con el test SCD fue muy alta (Chohan *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2010).

La simplicidad técnica, la fiabilidad, la rapidez en la obtención de resultados y la falta de requerimiento de equipo técnico costoso hacen del test SCD una técnica ideal para el estudio rutinario de la SDF en el laboratorio de andrología. Por otro lado, la versatilidad de la técnica y el hecho de que permita discriminar entre diferentes grados de daño en el ADN hacen del test SCD una técnica perfecta para su uso en investigación.

Técnicas basadas en las propiedades de algunos colorantes

Cromomicina A₃ (CMA₃)

La cromomicina A₃ (CMA₃) es un fluorocromo ampliamente utilizado en citogenética. Este colorante permite detectar espermatozoides que tienen un nivel deficiente de empaquetamiento de la cromatina (Manicardi *et al.* 1995). Es decir, es una prueba de maduración y condensación nuclear. El principio

de esta técnica consiste en que el fluorocromo se une específicamente a las regiones ricas en GC y compete con las protaminas por los lugares de unión al ADN. De esta manera, cuando los espermatozoides presentan una tinción intensa tras ser teñidos con CMA₃, significa que las células poseen un nivel bajo de protaminación. Los resultados se analizan con un microscopio de fluorescencia. El problema principal que presenta esta técnica es la subjetividad del observador a la hora de establecer los grupos de clasificación.

Azul de Toluidina

El azul de toluidina es un colorante nuclear básico que genera reacciones metacromáticas cuando interacciona con la cromatina. Cuando este colorante se incorpora a cromatina rica en histonas, con elevados residuos de lisina, presenta una coloración violeta-azulada intensa, mientras que cuando lo hace a cromatina rica en protaminas presenta una coloración azul pálido. Se trata, por tanto, de otra prueba que nos indica el nivel de maduración o condensación nuclear. El análisis de los resultados se realiza con microscopía de campo claro (Erenpreisa *et al.* 2003). La desventaja de esta técnica radica en la subjetividad del observador a la hora de diferenciar entre los diferentes tonos de azul.

A pesar de los diferentes enfoques y limitaciones, las diferentes técnicas producen resultados altamente correlacionables (Gorczyca *et al.* 1993a; Aravindan *et al.* 1997; Schmid *et al.* 2003; Erenpreiss *et al.* 2004; Chohan *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2010). Así, las principales ventajas o inconvenientes de cada procedimiento dependerán mucho del tiempo necesario para obtener resultados, del precio, o de los requerimientos de equipo técnico o personal cualificado.

5.3. Causas del daño en el ADN espermático.

Existen diferentes causas que se han correlacionado con un descenso en la fertilidad masculina y que, a su vez, podrían estar relacionadas con un aumento en los niveles de daño en el ADN espermático.

Cáncer

El cáncer testicular, la enfermedad de Hodgkin y la leucemia son algunas de las enfermedades oncológicas más comunes entre los hombres en edad reproductiva (Agarwal & Allamaneni 2005). Los avances en las terapias contra el cáncer han mejorado considerablemente las tasas de supervivencia, especialmente en pacientes jóvenes. Sin embargo, estas terapias son agresivas y, a menudo, presentan efectos secundarios. La infertilidad es una gran preocupación para aquellos hombres con cáncer que tienen que ser sometidos a radio y quimioterapia, ya que estos tratamientos afectan de manera negativa a la espermatogénesis (Meistrich 1993). El efecto de estos tratamientos sobre la espermatogénesis es variable, dependiendo del agente utilizado, de su dosis y de la duración del tratamiento (Smit *et al.* 2010). Además, no es posible predecir con certeza si la espermatogénesis volverá a la normalidad tras la terapia (Naysmith *et al.* 1998) y se ha establecido que entre 15% - 30% de los pacientes permanecen estériles tras meses o años de haber sido curados (Smit *et al.* 2010).

La criopreservación del semen antes del tratamiento de quimio o radioterapia es la mejor opción para mantener la fertilidad de los pacientes con cáncer, y con la introducción de técnicas de reproducción asistida, como la fecundación *in vitro* (FIV) y la ICSI, se pueden utilizar incluso muestras congeladas de espermatozoides de mala calidad con buenas expectativas de éxito (Meseguer *et al.* 2006). Aun así, se ha observado que un cierto porcentaje de pacientes con cáncer (13% - 30%) ya son azoospermicos cuando intentan producir eyaculados para congelar sus muestras de semen para el futuro (Ragni *et al.* 2005).

Dado que no es fácil conseguir muestras de este tipo de pacientes, no existen demasiados estudios en este tema y en la mayoría de ellos el número de pacientes estudiados no es demasiado alto. Existen muchas dudas acerca de si los tumores pueden afectar directamente a las células germinales testiculares; de si los tumores de origen testicular perjudican, por si mismos, a la espermatogénesis; y se han publicado resultados contradictorios con respecto a si el cáncer puede afectar a la integridad del ADN espermático (Stahl *et al.* 2009; Smit *et al.* 2010).

Infecciones genitourinarias

Chlamydia trachomatis es la infección bacteriana de transmisión sexual más extendida. Con casi 90 millones de casos de infección detectados al año en el mundo, esta infección es la principal causa de subfertilidad tanto en hombres como en mujeres (Paavonen & Eggert-Kruse 1999; World Health Organization 2001; Gonzales *et al.* 2004). En hombres, la infección por *Chlamydia trachomatis* es una de las principales causas de uretritis. Además, puede estar asociada con epididimitis, prostatitis y orquitis (Cunningham & Beagley 2008). La infección por *Mycoplasma spp.* también está altamente extendida y es muy habitual la coexistencia de dos o más patógenos en casos de enfermedades de transmisión sexual (Kilic *et al.* 2004).

En la literatura, existen evidencias contradictorias acerca de la influencia de *Chlamydia trachomatis* en la calidad espermática. Un gran número de estudios *in vivo* han sugerido que esta infección no se asocia con una alteración en los parámetros seminales (Weidner *et al.* 1996; Habermann & Krause 1999; Ochsendorf *et al.* 1999; Vigil *et al.* 2002; de Barbeyrac *et al.* 2006; Motrich *et al.* 2006; Gdoura *et al.* 2008; Günyeli *et al.* 2011). Otros, sin embargo, encuentran una correlación significativa entre la infección por *Chlamydia trachomatis* y un descenso en la movilidad (Cengiz *et al.* 1997; Gdoura *et al.* 2001; Jakiel *et al.* 2004; Veznik *et al.* 2004; Bezold *et al.* 2007), una reducción significativa de la concentración y la morfología (Cengiz *et al.* 1997; Veznik *et al.* 2004) y una mayor probabilidad de tener leucocitospermia (Hosseinzadeh *et al.* 2004). Por otro lado, Jungwirth *et al.* (2003) observaron que los espermatozoides de hombres infectados con *Chlamydia trachomatis* presentaban una ligera reducción en la capacidad para llevar a cabo la reacción acrosómica. Sin embargo, Vigil *et al.* (2002) no detectaron ninguna anomalía en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida ni en la capacidad para llevar a cabo la reacción acrosómica ni en la habilidad de los espermatozoides para penetrar el ovocito, concluyendo que la infección por *Chlamydia trachomatis* no afectaba a la función espermática. Finalmente, Idahl *et al.* (2004) observaron una asociación entre la presencia de anticuerpos de *Chlamydia trachomatis* en hombres asintomáticos, sin una clara influencia sobre los parámetros seminales clásicos, y un descenso en la probabilidad de conseguir un embarazo.

Mientras que los estudios *in vivo* proporcionan evidencias contradictorias acerca de si *Chlamydia trachomatis* se asocia con un descenso en la fertilidad, los estudios *in vitro* son más clarificadores. Se ha demostrado que la

incubación *in vitro* con *Chlamydia trachomatis* produce un descenso significativo en el número de espermatozoides móviles y da lugar a apoptosis (Hosseinzadeh *et al.* 2001; Satta *et al.* 2006). Hay evidencias que sugieren que el lipopolisacárido de *Chlamydia trachomatis* es el principal causante de la apoptosis en espermatozoides (Galdiero *et al.* 1994; Hosseinzadeh *et al.* 2003; Eley *et al.* 2005a). Eley *et al.* (2005b) proponen que el lipopolisacárido de *Chlamydia trachomatis* interacciona con los receptores CD14 de la membrana espermática, dando lugar a un incremento de la producción de ROS, que daría como resultado la apoptosis celular mediada por caspasas.

Mycoplasma spp es un habitante natural de la uretra masculina, contaminando el semen durante la eyaculación. Sin embargo, estos microorganismos son especies potencialmente patogénicas que juegan un importante papel en la etiología de las infecciones genitales y de la infertilidad masculina (Andrade-Rocha 2003). El impacto de *Mycoplasma* sobre los parámetros seminales y la fertilidad no está claro. Mientras que en estudios iniciales parecía clara la influencia negativa de *Mycoplasma* sobre los parámetros seminales y la fertilidad (Gnarpe & Friberg 1972; Gnarpe & Friberg 1973; Fowlkes *et al.* 1975), en estudios más recientes los resultados son contradictorios (Andrade-Rocha 2003; Günyeli *et al.* 2011).

Es probable que la dificultad que existe para diagnosticar con precisión a los individuos infectados por *Chlamydia trachomatis* y para poder discriminar entre infecciones que se están padeciendo en el momento del análisis e infecciones pasadas haya dado lugar a confusiones en la interpretación de los resultados de algunos estudios *in vivo*. Nuevos estudios *in vivo*, en los que se analice un gran número de individuos infectados que hayan sido diagnosticados con precisión, podrían ayudar a aclarar muchas dudas. Dado que se ha observado un aumento de la apoptosis en muestras incubadas con *Chlamydia trachomatis* o su lipopolisacárido, la SDF podría ser un buen marcador para estudiar el efecto de la infección por *Chlamydia trachomatis* sobre las células espermáticas.

Radiación

La radiación ionizante interactúa al azar con la materia, expulsando electrones y produciendo radicales libres reactivos. Tras la exposición a rayos X, la mayoría del daño en las biomoléculas es indirecto,

principalmente debido al ataque de radicales hidroxilo que se producen por la radiolisis de moléculas de agua cercanas a la biomolécula. La radiación ionizante produce roturas en el ADN de doble cadena o de cadena sencilla, diferentes tipos de daño en las bases, sitios abásicos, entrecruzamientos ADN-ADN y entrecruzamientos ADN-proteínas (Von Sonntag 1987; O'Neill & Fielden 1993). Este daño es detectado, marcado y reparado a través de varios mecanismos regulados con precisión. El daño en el ADN que no se repara o que se repara mal puede dar lugar a mutaciones, aberraciones cromosómicas o muerte celular, a través de la activación de la apoptosis (Khanna & Jackson 2001; Borges *et al.* 2008). Por supuesto, si el daño en el ADN ocurre en el espermatozoide, no podrá ser reparado antes de la fecundación del ovocito. La radioexposición de los testículos conlleva la muerte celular de las subpoblaciones radiosensibles, principalmente las espermatogonias intermedias. A pesar de esto, los espermatozoides maduros parecen ser células radioresistentes, como se demostró por irradiación *in vitro* (Haines *et al.* 1998) y en ratones *in vivo* (Sailer *et al.* 1995; Haines *et al.* 2002; Cordelli *et al.* 2003); estos estudios no detectaron roturas en el ADN, incluso tras una dosis de rayos X de 4 Gy, cuando se analizaron mediante SCSA o ensayo del cometa. Utilizando DBD-FISH, un test muy sensible, sólo se detectó daño en el ADN espermático tras la utilización de dosis extremadamente altas (Fernández *et al.* 2000).

Hipertermia testicular

El funcionamiento normal del testículo es dependiente de la temperatura y, en la mayoría de los mamíferos, los testículos se mantienen entre 2°C y 8°C por debajo de la temperatura corporal debido a que se encuentran alojados fuera del cuerpo, en la bolsa escrotal (Harrison & Weiner 1948; Ivell 2007).

El estrés térmico tiene un efecto perjudicial sobre la espermatogénesis; los espermatoцитos y las espermátidas parecen ser muy sensibles al estrés por calor, dando lugar a un aumento de la apoptosis. Como resultado del estrés por calor, la calidad del semen disminuye, incrementando la incidencia de espermatozoides inmaduros anormales y dando lugar a subfertilidad o infertilidad (Mieusset *et al.* 1987).

Existen resultados contradictorios con respecto al efecto de las altas temperaturas sobre el ADN de los espermatozoides maduros. Ciertos estudios, realizados en animales, detectan un aumento de la fragmentación

del ADN en espermatozoides maduros tras la exposición de los testículos a altas temperaturas. En estas publicaciones, se ha sugerido que el daño en el ADN espermático podría ser el resultado de un ambiente desfavorable en el epidídimo, debido a un aumento del estrés oxidativo por el incremento de la temperatura en el epidídimo (Banks *et al.* 2005). Sin embargo, otros autores sólo detectan daño en el ADN de espermatozoides y espermátidas (Love & Kenney 1999; Banks *et al.* 2005).

5.4. Significado clínico del daño en el ADN espermático.

La infertilidad se define como un estado en el cual una pareja que desea tener un hijo es incapaz de concebir tras 12 meses manteniendo relaciones sexuales sin protección (Seshagiri 2001). Afecta aproximadamente al 15% de las parejas y se estima que el factor masculino es responsable de aproximadamente el 50% de los casos de infertilidad. Estudios recientes indican que el número de parejas infértiles está aumentando en la población general (Feng 2003) y esto ha provocado que en los últimos años se dispare el número de parejas que acuden a clínicas de fertilidad para recurrir al uso de técnicas de reproducción asistida para solucionar sus problemas de infertilidad. Se ha sugerido que la integridad del ADN podría ser un marcador más objetivo de la función espermática que el análisis de los parámetros seminales estándar (Agarwal & Said 2003). Se han publicado multitud de artículos tratando de correlacionar la integridad del ADN espermático con el embarazo, tanto obtenido de manera natural como mediante técnicas de reproducción asistida.

Embarazo natural

Existen muchos estudios, utilizando diferentes técnicas para medir el daño en el ADN espermático, que demuestran que los hombres infértiles poseen un nivel de daño en el ADN espermático significativamente mayor que los hombres fértiles (Evenson *et al.* 1999; Host *et al.* 1999; Gandini *et al.* 2000; Spano *et al.* 2000; Zini *et al.* 2001; Saleh *et al.* 2002b; Zini *et al.* 2002; Saleh *et al.* 2003a; Saleh *et al.* 2003b; Sergerie *et al.* 2005a). Diferentes grupos han sugerido que podría existir un umbral de daño en el ADN por encima del cual la probabilidad de obtener un embarazo sería cercana a cero. Sergerie *et*

al. (2005b), en un estudio en el que analizan la SDF con TUNEL, sugieren que un valor umbral del 20% permite diferenciar entre controles fértiles y pacientes infértiles. Evenson *et al.* (1999) y Spano *et al.* (2000) en otros estudios, en los que se analiza la SDF utilizando la técnica de SCSA, proponen que con un nivel de SDF $\geq 30\%$ o $> 40\%$, respectivamente, la probabilidad de obtener un embarazo sería muy próxima a cero. Aunque no todos los autores logran establecer un umbral de SDF que permita predecir el embarazo, como tendencia general, todos estos estudios asocian el aumento del daño en el ADN espermático con un aumento en el tiempo necesario para obtener un embarazo y con un descenso en la probabilidad de conseguir un embarazo natural (Evenson *et al.* 1999; Spano *et al.* 2000; Loft *et al.* 2003; Giwercman *et al.* 2010). Una revisión sistemática con meta-análisis publicada recientemente, que analiza los datos de tres estudios en los que se utiliza SCSA para determinar la SDF, correlaciona claramente la presencia de altos niveles de SDF con la imposibilidad de conseguir un embarazo de manera natural (Razón de probabilidades (OR; *Odds ratio*) = 7,01; intervalo de confianza (IC) 95% = 3,68, 13,36; $p < 0,001$) (Zini 2011).

Inseminación intrauterina (IUI)

La IUI es una técnica de reproducción asistida que consiste en la colocación artificial del semen del paciente en el interior del útero de la mujer. Está indicada en parejas en las que el hombre presenta un factor de infertilidad no severo, parejas en las que la mujer no ovula normalmente o presenta algún defecto en el moco cervical que lo convierte en un medio hostil para los espermatozoides y parejas con esterilidad de origen desconocido. Es una de las modalidades más utilizadas para el tratamiento de la infertilidad, con una tasa de éxito que oscila entre un 5% y un 66% (Allen *et al.* 1985). Varios estudios que analizan la influencia de la SDF sobre la probabilidad de obtener embarazo tras IUI indican que el daño en el ADN espermático es mayor en aquellas parejas que no consiguen embarazo (Duran *et al.* 2002; Saleh *et al.* 2003a; Bungum *et al.* 2004; Evenson & Wixon 2006a; Muriel *et al.* 2006b; Bungum *et al.* 2007; Thomson *et al.* 2011), aunque no en todos los casos se alcanzó significación estadística (Muriel *et al.* 2006b; Thomson *et al.* 2011). En el estudio de Duran *et al.* (2002) observan que no hay ninguna muestra con SDF $> 12\%$ medida con TUNEL que dé lugar a embarazo. Un meta-análisis llevado a cabo por Evenson y Wixon (2006a) para investigar la relación entre la tasa de embarazo y la SDF medida con SCSA, indicó que los

pacientes con una SDF < 30% tenían 7,3 veces (IC = 2,88, 18,30, $p = 0,0001$) más probabilidades de conseguir embarazo usando IUI. De entre todos los estudios llevados a cabo para analizar cómo afecta la SDF a la probabilidad de obtener un embarazo mediante IUI, probablemente, el más robusto es el desarrollado por Bungum *et al.* (2007). En este estudio se utilizan los datos de 387 ciclos de IUI. Zini (2011) analiza estos datos en su meta-análisis, obteniendo que cuando la SDF > 30%, la tasa de embarazo tras IUI se reduce de manera significativa (OR = 9,9; IC 95% 2,37, 41,51; $p < 0,001$).

Fecundación in vitro (FIV)

Cuando el factor masculino o femenino es severo o tras varios intentos fallidos de IUI, la técnica de reproducción asistida empleada es la FIV. En esta técnica, tras realizar una estimulación artificial del ovario, se realiza una extracción de los ovocitos para inseminarlos *in vitro*. A continuación, los embriones conseguidos se cultivan y se transfieren al útero de la mujer. En los últimos años se han publicado una gran cantidad de estudios clínicos que evalúan la relación entre la integridad del ADN espermático y la probabilidad de obtener embarazo tras FIV. Mientras que los test de integridad del ADN parecen tener un alto valor predictivo para los resultados de fecundación *in vivo*, la relación con la FIV es más polémica. Varios estudios clínicos han encontrado una correlación significativa entre la SDF y la tasa de fecundación en FIV (Host *et al.* 2000; Huang *et al.* 2005; Borini *et al.* 2006; Muriel *et al.* 2006a; Bakos *et al.* 2008; Vélez de la Calle *et al.* 2008; Gu *et al.* 2009; Tarozzi *et al.* 2009), sin embargo, muchos otros (Tomlinson *et al.* 2001; Tomsu *et al.* 2002; Henkel *et al.* 2003; Virro *et al.* 2004; Benchaib *et al.* 2007; Frydman *et al.* 2008; Lin *et al.* 2008) no encuentran tal correlación. Quizás, la tasa de embarazo sea el parámetro más importante a considerar en relación con el daño en el ADN espermático y, desafortunadamente, tampoco hay acuerdo en este caso. Hay autores que publican que es significativamente más probable obtener un embarazo tras FIV con muestras de espermatozoides con un bajo nivel de SDF (Filatov *et al.* 1999; Host *et al.* 2000; Henkel *et al.* 2003; Bakos *et al.* 2008; Frydman *et al.* 2008; Gu *et al.* 2009; Tarozzi *et al.* 2009), mientras que otros autores (Tomlinson *et al.* 2001; Tomsu *et al.* 2002; Bungum *et al.* 2004; Huang *et al.* 2005; Boe-Hansen *et al.* 2006; Borini *et al.* 2006; Muriel *et al.* 2006a; Benchaib *et al.* 2007; Bungum *et al.* 2007; Lin *et al.* 2008; Vélez de la Calle *et al.* 2008) no encuentran esta relación. En un meta-análisis reciente de 11 estudios de FIV

se obtiene un OR combinado de 1,70 (IC 95% = 1,30, 2,23, $p < 0,05$), lo cual sugiere una modesta influencia del daño en el ADN espermático sobre la tasa de embarazo (Zini 2011), lo cual coincide con otros meta-análisis llevados a cabo por otros autores (Evenson & Wixon 2006a; Collins *et al.* 2008).

Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)

En casos de factor masculino severo, fallos de fecundación previos con FIV o situaciones en las que se dispone de un número limitado de ovocitos, la alternativa es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Este tratamiento se diferencia de la FIV convencional en la forma en la que se inseminan los ovocitos. Mientras que en la FIV convencional se coloca en la placa de cultivo un ovocito rodeado de espermatozoides, en la ICSI la inseminación se realiza inyectando un espermatozoide vivo, previamente seleccionado, en el citoplasma del ovocito, con la ayuda de una pipeta. Muchos autores han intentado establecer una relación entre la SDF y las tasas de embarazo obtenidas por ICSI pero son más abundantes los estudios que no encuentran esta correlación (Hammadeh *et al.* 1996; Host *et al.* 2000; Henkel *et al.* 2003; Bungum *et al.* 2004; Gandini *et al.* 2004; Huang *et al.* 2005; Zini *et al.* 2005; Boe-Hansen *et al.* 2006; Muriel *et al.* 2006b; Benchaib *et al.* 2007; Bungum *et al.* 2007; Lin *et al.* 2008; Vélez de la Calle *et al.* 2008; Tarozzi *et al.* 2009; Thomson *et al.* 2011) que los que sí la encuentran (Borini *et al.* 2006; Bakos *et al.* 2008; Micinski *et al.* 2009). Es más, en varias revisiones sistemáticas con meta-análisis llevadas a cabo en los últimos años tampoco se logró establecer ninguna correlación estadísticamente significativa (Evenson & Wixon 2006a; Li *et al.* 2006; Zini 2011).

A la vista de la gran cantidad de trabajos publicados, parece que la integridad del ADN espermático es particularmente importante cuando la fecundación ocurre de un modo más natural, como en el caso de los embarazos naturales o la IUI. Por otro lado, cuando se trata de FIV o ICSI, los test de integridad del ADN espermático parecen perder su poder predictivo. Los trabajos publicados parecen indicar que cuando los niveles de daño en el ADN son muy altos, la probabilidad de obtener un embarazo es muy baja. Sin embargo, a pesar de los muchos intentos, hasta ahora no se ha logrado establecer un umbral por encima del cual no se produzca un embarazo. Probablemente, la explicación a esto está en una gran cantidad de factores que complican la interpretación de los resultados:

- a. *Selección de espermatozoides y embriones en reproducción asistida.* En todos los tratamientos de reproducción asistida se utilizan diferentes técnicas de selección de espermatozoides con el fin de incrementar su potencial para fecundar. Con el uso de estas técnicas, se eliminan del eyaculado el plasma seminal, los restos celulares y los espermatozoides muertos, inmóviles o lentos. Finalmente, se logra concentrar en un pequeño volumen la población de espermatozoides con mayor movilidad y mayor capacidad de fecundación. Una de las técnicas de selección de espermatozoides más utilizada es la técnica de *swim-up*. Se ha demostrado que la población de espermatozoides seleccionados por *swim-up* presenta un porcentaje espermatozoides con el ADN fragmentado menor que el resto de la población espermática (Spano *et al.* 2000). De la misma manera, cuando se seleccionan espermatozoides en base a su morfología para la ICSI, es probable que se estén seleccionando aquellos espermatozoides que no tienen el ADN fragmentado (Varghese *et al.* 2009). Por otro lado, como la calidad embrionaria se correlaciona con la SDF (Muriel *et al.* 2006a; Vélez de la Calle *et al.* 2008), es probable que los embriones seleccionados para transferir en FIV e ICSI hayan resultado de la fecundación de los espermatozoides con menos daño en el ADN. Como consecuencia, es muy posible que todos estos procesos de selección que se llevan a cabo en FIV e ICSI estén enmascarando la influencia de la SDF sobre la probabilidad de obtener un embarazo.
- b. *Tipo de daño.* Según las hipótesis del origen del daño en el ADN espermático, podríamos esperar diferentes tipos de daño. Las nucleasas que fragmentan el ADN en procesos apoptóticos pueden producir tanto roturas de cadena sencilla como roturas de cadena doble. Las roturas producidas por la topoisomerasa II, durante la remodelación de la cromatina, en la espermatogénesis, parecen corresponder a roturas de doble cadena (Laberge & Boissonneault 2005). Las ROS y otros radicales, como los derivados del NO[•], generarían principalmente roturas de cadena sencilla y diferentes modificaciones en las bases del ADN (Reiter 2006), aunque también podrían inducir la creación de roturas de doble cadena (Macip *et al.* 2003). Las roturas de doble cadena son las lesiones más peligrosas. Son las principales responsables de la creación de aberraciones cromosómicas y de desencadenar respuestas apoptóticas en células somáticas.

- c. *Heterogeneidad de la población espermática.* Otro factor a considerar es si el daño afecta a toda la población espermática o sólo a una fracción de ella. Evenson *et al.* (2002) postularon que cuando la frecuencia de células fragmentadas en una muestra espermática, analizada mediante SCSA, era $\geq 30\%$, la probabilidad de obtener un embarazo viable era extremadamente baja debido a lo que ellos denominaron “efecto iceberg”. Según esta hipótesis, los espermatozoides que no tienen el ADN fragmentado contendrían algún tipo de daño no compatible con un embarazo viable. Se ha propuesto que el daño oxidativo en las bases del ADN, como la 8-oxoG, podría ser el responsable de este “efecto iceberg” (Álvarez 2005; Makhoulouf & Niederberger 2006). Por otro lado, en estudios posteriores, en los cuales se empleó la misma técnica para analizar el daño en el ADN, no se ha detectado este umbral de daño por encima del cual un embarazo viable se hace poco probable, y se han publicado datos que indican que se han obtenido embarazos con muestras espermáticas que contenían elevados valores de SDF (Gandini *et al.* 2004; Payne *et al.* 2005).
- d. *Si el daño en el ADN afecta a regiones codificantes o no codificantes.* El ADN no codificante representa más de un 90% del total, con lo cual la probabilidad de que el daño en el ADN afecte a las regiones codificantes es relativamente baja. Debido a esto hay autores que proponen que la mayoría de las lesiones que ocurren en el ADN no serían peligrosas. Esto podría explicar, al menos en parte, por qué niveles altos de SDF pueden dar lugar a embarazos viables (Álvarez 2005). Sin embargo, las roturas de doble cadena y otros tipos de lesiones, sobre todo si son abundantes, podrían desencadenar una respuesta apoptótica o una parada del ciclo celular, tras la fecundación. Además, podrían quedar lesiones en el ADN sin reparar o mal reparadas, dando lugar a aberraciones cromosómicas estructurales que podrían llevar a la muerte celular en el primer ciclo celular o en los siguientes. Tanto el desencadenamiento de una respuesta apoptótica, como la muerte celular o las aberraciones cromosómicas, pueden ocurrir independientemente de que la lesión se encuentre en una región codificante o no codificante del ADN (Fernández *et al.* 2009).
- e. *Capacidad del ovocito para reparar el daño en el ADN espermático.* Los ovocitos de mamíferos tienen la maquinaria de reparación del ADN

activa durante la ovogénesis, y pueden reparar los genomas materno y paterno tras la fecundación (Marchetti *et al.* 2007). Esta capacidad de reparación es limitada y podría variar entre ovocitos de diferentes pacientes e incluso entre ovocitos del mismo paciente. Dependerá, por un lado, de la calidad del ovocito, que a su vez depende de la edad de la mujer, y, por otro, de la cantidad y del tipo de daño que contenga el espermatozoide. De todos los factores que afectan al valor predictivo de los test de SDF, la habilidad del ovocito para reparar el daño podría ser el más importante. Supongamos que un espermatozoide que porta daño en su ADN fecunda a un ovocito que es capaz de reparar este daño, si el daño ha sido bien reparado, no habrá ninguna consecuencia para el embrión y el desarrollo del feto. Pero nosotros no podemos saber si el ovocito fue capaz de reparar ese daño, y por eso no hubo ninguna consecuencia, o si, por el contrario, el daño no fue correctamente reparado pero no afectó al desarrollo del embrión y del feto. En este sentido, los estudios en modelos animales, en los cuales se puede realizar FIV e ICSI controlando estrictamente el daño que portan los espermatozoides empleados para fecundar ovocitos de calidades similares, pueden aportar mucha luz a este tema. En humanos, la donación de óvulos es una herramienta útil que permite estudiar la calidad del esperma utilizado en tratamientos de reproducción asistida, ya que reduce la variabilidad de la calidad del ovocito asociada a la infertilidad femenina.

- f. *Dinámica de la fragmentación del ADN espermático.* La SDF es un proceso dinámico que aumenta progresivamente con el tiempo tras la eyaculación o tras la descongelación de muestras criopreservadas (Gosálvez *et al.* 2009a; Gosálvez *et al.* 2009b; Jackson *et al.* 2010; Matsuura *et al.* 2010). En este sentido y dado que puede transcurrir bastante tiempo desde que se obtiene una muestra para reproducción asistida hasta que se usa, es muy probable que en el momento de la IUI, la FIV o la ICSI, la SDF sea mayor que justo tras la eyaculación. En la literatura, rara vez se hace referencia a los períodos de tiempo transcurridos desde que se obtiene una muestra hasta que se utiliza para reproducción asistida y, de la misma manera, tampoco se suele citar el momento en el que se estudió la SDF. Es posible que el comportamiento dinámico de la SDF también esté afectando al valor predictivo de los test de SDF (Gosálvez *et al.* 2011a). Aunque la dinámica de la SDF es una característica específica de especie, en humanos hay una gran variabilidad entre individuos y quizás esta

variación entre pacientes podría utilizarse como diagnóstico o como una medida para predecir fertilidad (Gosálvez *et al.* 2011b).

5.5. ¿Es seguro el uso de espermatozoides con daño en el ADN en reproducción asistida?

El desarrollo de la ICSI, para introducir directamente el genoma masculino en el ovocito, ha supuesto un gran avance en la reproducción asistida. La ICSI supera muchos de los problemas relacionados con la producción de un bajo número de espermatozoides, así como los problemas relacionados con fallos en los mecanismos de fecundación. Sin embargo, como la selección de espermatozoides para ICSI se basa solamente en su movilidad y morfología, el hecho de que se pueda estar introduciendo inadvertidamente un genoma paterno defectuoso preocupa a la comunidad científica (Campbell & Irvine 2000; Hargreave 2000; Mortimer 2000; Sakkas *et al.* 2000). Cada vez hay más evidencias en la literatura que apuntan hacia alteraciones en la integridad nuclear del gameto masculino como la causa de desórdenes genéticos *de novo*, defectos morfológicos y en el desarrollo, cáncer y aborto espontáneo (Tesarik *et al.* 2004; Marchetti & Wyrobek 2005; Emery & Carrell 2006; Kleinhaus *et al.* 2006). La incidencia de defectos congénitos en niños concebidos por reproducción asistida es el doble que el observado en niños concebidos de manera natural (Hansen *et al.* 2002). Además, los niños nacidos por reproducción asistida tienen también más probabilidades de entrar en la unidad de cuidados intensivos de neonatos, de ser hospitalizados y de estar en el hospital más tiempo que los niños nacidos de forma natural (Hansen *et al.* 2008). Otros estudios han revelado un incremento de ocho veces en la incidencia de criptorquidia en niños concebidos por ICSI (Ludwig *et al.* 2009) y una vascularización anormal de la retina en estos niños (Wikstrand *et al.* 2008). De la misma manera que han surgido estas preocupantes publicaciones, hay otros autores que han sido mucho más tranquilizadores con respecto a la normalidad de los niños concebidos por ICSI (Bungum *et al.* 2012), particularmente en lo referente a su desarrollo cognitivo y habilidades motrices (Place & Englert 2003). En un meta-análisis reciente, en el que se incluyen 56 estudios, los autores concluyen que el riesgo de defectos en el nacimiento aumenta significativamente en niños concebidos por reproducción asistida, pero este riesgo no es mayor en niños concebidos por ICSI que en niños concebidos

por FIV (Wen *et al.* 2012). Todavía queda mucho por discutir acerca de este tema y los estudios con animales podrían ser muy útiles para estudiar los efectos a largo plazo de la SDF sobre el desarrollo. Un estudio experimental realizado en ratones demostró que cuando se llevaba a cabo ICSI utilizando semen con un alto porcentaje de células con el ADN fragmentado se reducía la tasa de desarrollo del embrión antes de la implantación y se producía un menor número de descendientes (Fernández-González *et al.* 2008). Además, este estudio demostró que la descendencia de animales producidos con semen con altos niveles de SDF presentaba problemas de comportamiento, como aumento de la ansiedad, falta de un patrón de adaptación, déficit en la memoria espacial a corto plazo, etc. Estos animales también presentaron mayor frecuencia de tumores y envejecimiento prematuro, sugiriendo que, a pesar de la habilidad del ovocito para reparar espermatozoides con el ADN dañado (Ahmadi & Ng 1999), una reparación incompleta o anormal podría dar lugar a patologías a largo plazo.

•••

A pesar de que en los últimos años ha aumentado enormemente la cantidad de publicaciones centradas en el estudio del ADN espermático, las principales cuestiones todavía están sin resolver. Muchos investigadores se han centrado en determinar el origen, las causas y las consecuencias del daño en el ADN de la línea germinal para poder determinar cómo prevenirlo y, a menudo, los resultados contradictorios han dado lugar a grandes polémicas.

Con respecto a los mecanismos que causan la SDF, los últimos estudios han llevado a sus autores a concluir que el daño oxidativo podría ser el mayor contribuyente al daño en el ADN observado en la línea germinal. En estos estudios observan que la 8-oxoG es la principal modificación en las bases presente en el ADN del espermatozoide humano. En este sentido, nos pareció interesante analizar de manera simultánea, en la misma célula, la presencia de daño oxidativo y la integridad del ADN, lo cual nos permitiría establecer una relación clara entre ambos sucesos.

También, nos pareció interesante estudiar la condición proteica de la matriz nuclear en estas células que tienen al ADN fragmentado, ya que otra de las

hipótesis que se baraja es que la SDF podría estar originada por un mecanismo apoptótico, y en células somáticas apoptóticas la fragmentación del ADN aparece asociada con modificaciones en la matriz nuclear (Martelli *et al.* 2001).

En términos de consecuencias, nos pareció interesante estudiar la relación entre el daño en el ADN y la integridad telomérica. Los telómeros se sitúan en la periferia del núcleo espermático, en una posición que sugiere que podrían ser vulnerables al ataque oxidativo (Zalensky *et al.* 1995). Si los espermatozoides que sufren daño oxidativo tienen los telómeros más cortos, esto podría afectar a la salud y especialmente a la longevidad de la progenie.

Existen diferentes causas que se han correlacionado con un descenso en la fertilidad masculina y que a su vez podrían estar relacionadas con un aumento en los niveles de daño en el ADN espermático. El cáncer es una de estas causas. No es fácil conseguir muestras de pacientes con cáncer y debido a esto no existen demasiados estudios en este tema. Nosotros hemos estudiado, en un grupo de 75 pacientes con cáncer, la influencia que tiene la enfermedad sobre la SDF.

Las infecciones genitourinarias también se asocian con un descenso en la fertilidad. De entre ellas, la infección por *Chlamydia trachomatis* es la más extendida. Los estudios *in vitro* parecen indicar una relación entre la infección y un aumento de la SDF, sin embargo, los estudios *in vivo* ofrecen resultados contradictorios. Nosotros nos propusimos estudiar esta relación en un grupo de 143 pacientes infectados con *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*

Con la intención de evaluar el valor predictivo de los test de SDF, en los últimos años se han publicado multitud de estudios en los que se analiza el efecto de la SDF sobre la reproducción. En estos estudios parece que la integridad del ADN espermático es particularmente importante cuando la fecundación ocurre de un modo más natural (embarazos naturales o IUI). Sin embargo, cuando se trata de FIV o ICSI, los test de integridad del ADN espermático parecen tener un poder predictivo irregular. Esto podría ser debido a que existen diferentes factores de confusión que complican la interpretación de los resultados. Nosotros nos propusimos analizar estas variables que podrían estar actuando como factores de sesgo, con la intención de cuantificar el efecto real de la SDF sobre los resultados en reproducción asistida.

En esta misma línea, estudios recientes indican que la SDF es un proceso dinámico que aumenta de manera progresiva tras la eyaculación o tras la descongelación de muestras criopreservadas. Además, también se ha observado que la cinética de la SDF varía entre individuos y que no depende de la fragmentación inicial de la muestra, con lo cual podría ser una herramienta útil para predecir fertilidad. Nosotros nos propusimos evaluar la dinámica de la SDF en muestras de donantes sometidas a diferentes tóxicos de efecto conocido, con la intención de averiguar si el estudio dinámico de la SDF podría revelar algún tipo de daño que en un análisis estático de la SDF pasaría inadvertido.

Para la realización de los trabajos que se presentan en esta tesis doctoral, se ha contado con una técnica desarrollada hace relativamente poco por el grupo de investigación del que ahora formo parte, el test SCD.

Objetivos



Para la realización de este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. *Estudiar la relación entre la fragmentación y la presencia de 8-oxoG en el ADN de espermatozoides humanos.*

- ¿Es posible desarrollar un ensayo que nos permita determinar de manera simultánea (en la misma célula) la fragmentación del ADN y la hidroxilación de la guanina en muestras de espermatozoides?
- ¿Cuál es la frecuencia y cómo se distribuyen la fragmentación del ADN y la 8-oxoG en muestras espermáticas de pacientes sometidos a tratamiento de fertilidad?
- Cuando estudiamos muestras espermáticas con un nivel de fragmentación mayor del 30%, ¿podemos atribuir el “efecto iceberg” a la presencia de niveles elevados de 8-oxoG en la población de células que no tienen el ADN fragmentado?

2. *Estudiar la matriz nuclear en células espermáticas con el ADN fragmentado.*

- ¿Existen diferencias en la matriz proteica nuclear entre células espermáticas con el ADN fragmentado y las que no lo tienen?
- ¿El fenómeno que da lugar a la fragmentación del ADN espermático también produce modificaciones en la matriz proteica nuclear?

3. *Evaluar la longitud media de la secuencia de ADN telomérico y su relación con la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos.*

- ¿Existe alguna relación entre la fragmentación del ADN espermático y la longitud telomérica?
- ¿Existen diferencias en cuanto al tamaño del telómero y a la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado entre la población de espermatozoides con alta movilidad y el resto de células espermáticas?

4. Estudiar el efecto del cáncer sobre la fragmentación del ADN espermático.

- ¿Existen diferencias en los niveles de fragmentación del ADN espermático entre pacientes con diferentes tipos de cáncer?
- ¿Existen diferencias en los niveles de fragmentación del ADN espermático entre pacientes con cáncer, pacientes infértiles y donantes de fertilidad probada?

5. Estudiar el efecto de la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* sobre la fragmentación del ADN espermático.

- ¿Inducen *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* fragmentación en el ADN espermático *in vivo*?
- ¿Disminuye la fragmentación del ADN espermático en individuos infectados con *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* tras un tratamiento con antibióticos?
- ¿Afecta la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* a la probabilidad de obtener embarazo?

6. Cuantificar el efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre el resultado en reproducción asistida evaluando, mediante regresión logística, diferentes variables que podrían actuar como factores de sesgo y que podrían interferir con los análisis estadísticos.

- ¿Afecta el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado a la probabilidad de obtener un embarazo mediante reproducción asistida?
- ¿Podrían el origen de la muestra espermática (muestras frescas *vs* muestras congeladas) o el tipo de procedimiento de inseminación utilizado (FIV *vs* ICSI) modificar el efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre la probabilidad de obtener un embarazo? Es decir, ¿podrían estos factores estar actuando como factores de confusión en los análisis estadísticos en los que se trata de correlacionar la fragmentación del ADN espermático con la probabilidad de obtener un embarazo?

- Para determinar el impacto de la fragmentación del ADN espermático sobre la probabilidad de obtener un embarazo mediante reproducción asistida, ¿es más útil la evaluación de la fragmentación del ADN espermático tras la selección de espermatozoides por la técnica de *swim-up* que la evaluación de la fragmentación en la muestra en fresco?
- ¿Depende el efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre la probabilidad de obtener un embarazo de la calidad del ovocito empleado (ovocitos de pacientes infértiles *vs* ovocitos de donantes jóvenes y fértiles)?

7. *Evaluar la dinámica de la fragmentación del ADN espermático, es decir, la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado a lo largo del tiempo, como indicador en toxicología reproductiva.*

- Tras la exposición *in vitro* de muestras de donantes a radiación ionizante, temperatura elevada, pH ácido y óxido nítrico, ¿cómo evoluciona la fragmentación del ADN espermático a lo largo del tiempo?
- ¿Es el procedimiento dinámico un análisis útil en el contexto de la toxicología reproductiva? ¿Nos permitirá ver algún daño latente que no sería revelado en un estudio inicial?

Material y Métodos



Objetivo 1.

Estudio de la relación entre la fragmentación y la presencia de 8-oxoG en el ADN de espermatozoides humanos.

*Muestras de Semen**

En primer lugar, nos propusimos desarrollar un ensayo que permitiera determinar de manera simultánea la SDF y la hidroxilación de la guanina. Para ello, utilizamos una muestra de un donante fértil normozoospermico.

Para estudiar la frecuencia y distribución de la SDF y la 8-oxoG en pacientes sometidos a tratamiento de infertilidad, utilizamos 31 muestras de semen, 4 pertenecientes a donantes fértiles y 27 de hombres que asistieron con algún problema al Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia). Las muestras seminales se clasificaron siguiendo los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization 1999). De esta manera, las muestras con una proporción de formas normales < 14% se denominan teratozoospermicas, las que tienen una concentración de espermatozoides inferior a 20 millones/ml se denominan oligozoospermicas y las que tienen menos de 50% de formas móviles se denominan astenozoospermicas. Las muestras astenoteratozoospermicas son aquellas que tienen alterados los valores de referencia de movilidad y morfología y las muestras oligoastenoteratozoospermicas son aquellas que tienen alterados los valores de referencia de concentración, movilidad y morfología. De las 31 muestras analizadas, 10 eran normozoospermicas, 8 teratozoospermicas, 2 oligozoospermicas, 8 astenoteratozoospermicas y 3 oligoastenoteratozoospermicas.

Con la intención de evaluar si el “efecto iceberg” depende del daño oxidativo en las bases del ADN de la población de células que no tiene el ADN fragmentado, estudiamos la frecuencia y distribución de la 8-oxoG en un grupo de 20 pacientes con una SDF > 30% (30,9 - 59,0%). De los 20 pacientes, 9 dieron embarazo tras ICSI y 11 no.

Las muestras de semen se congelaron en nitrógeno líquido hasta que fueron procesadas para la determinación de la SDF.

Todos los pacientes que participaron en el estudio proporcionaron un consentimiento informado para utilizar las muestras seminales para investigación.

Procedimientos de reproducción asistida*

La estimulación ovárica controlada y la inseminación de los ovocitos recuperados se llevó a cabo según los procedimientos habituales de inseminación por ICSI (Meseguer *et al.* 2003). Las muestras espermáticas utilizadas para los ciclos de ICSI fueron seleccionadas por la técnica de *swim-up*. Para ello, los eyaculados frescos se diluyeron con medio de cultivo HTF (*Human tubal fluid*, LifeGlobal, Barcelona, España) en una proporción 1:1, se centrifugaron a 400g durante 10 min y se descartaron los sobrenadantes. Se añadió 0,5 - 1 ml de medio HTF fresco, sin alterar el pellet, y se incubó, durante 45 min, con una inclinación de 45°. Finalmente, se seleccionaron 0,1 - 0,5 ml de la parte superior del sobrenadante, que es donde se encuentran los espermatozoides más rápidos. El embarazo clínico se confirmó, mediante ecografía, cuando se detectó el saco gestacional con latido fetal a las 7 semanas. El aborto se determinó cuando un embarazo no logró llegar a la semana 22 tras la detección del saco gestacional.

Determinación de la fragmentación del ADN espermático y marcaje de 8-oxoG

La SDF se determinó mediante el test SCD, utilizando el kit Halosperm® (Halotech-DNA SL, Madrid, España) (Figura 15). Para esto, se descongeló una alícuota de semen y se diluyó a una concentración de 5-10 millones de espermatozoides/ml en tampón fosfato salino (PBS). El kit proporciona tubos de 0,2 ml con agarosa de bajo punto de fusión, que hay que calentar durante unos segundos en el microondas para que se funda y a continuación dejar atemperar en un baño a 37°C. Se añadieron 25 µl de la muestra de semen al tubo con agarosa y se mezclaron bien. Se pipetearon 10µl de la mezcla de semen-agarosa sobre un portaobjetos previamente gelificado con agarosa, que también proporciona el kit, y se cubrió con un cubreobjetos de 18x18 mm. Se colocó el portaobjetos sobre una placa fría en la nevera (4°C) durante 5 min para permitir que la agarosa formara un microgel con las células incluidas en su interior. A continuación, se eliminó el cubreobjetos y

se sumergió el portaobjetos horizontalmente en una solución de HCl, proporcionada por el kit, durante 7 min a temperatura ambiente (23°C) y, seguidamente, en una solución de lisis durante 25 min. Tras lavar durante 5 min en una cubeta con abundante agua destilada, se deshidrató la muestra sumergiendo el portaobjetos en baños crecientes de etanol (70-90-100%), durante 2 min cada uno, y se dejó secar al aire.

Para detectar la 8-oxoG, se utilizó el kit *OxiDNA assay* (Calbiochem, Barcelona, España) sobre portas procesados para el test SCD. Los portaobjetos de SCD, deshidratados y secos, se lavaron dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con la solución de lavado que proporciona el kit. A continuación, se pipetearon 100 µl de la solución bloqueante sobre los portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos y se incubaron a 37°C durante 60 min en una cámara húmeda. Se eliminó el cubreobjetos y se inclinó el portaobjetos para decantar el exceso de solución bloqueante. Se lavaron los portaobjetos tres veces, durante 3 min, y se eliminó el exceso de solución de lavado. Se añadieron 100µl de la sonda de 8-oxoG conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), se cubrió el portaobjetos con un cubreobjetos y se incubó durante 60 min a 37°C en una cámara húmeda en oscuridad. Tras tres lavados de 2 min en solución de lavado, los portaobjetos se contratiñeron con DAPI (2 µg/ml) (Roche Diagnostics, Barcelona, España) en Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (Figura 15).

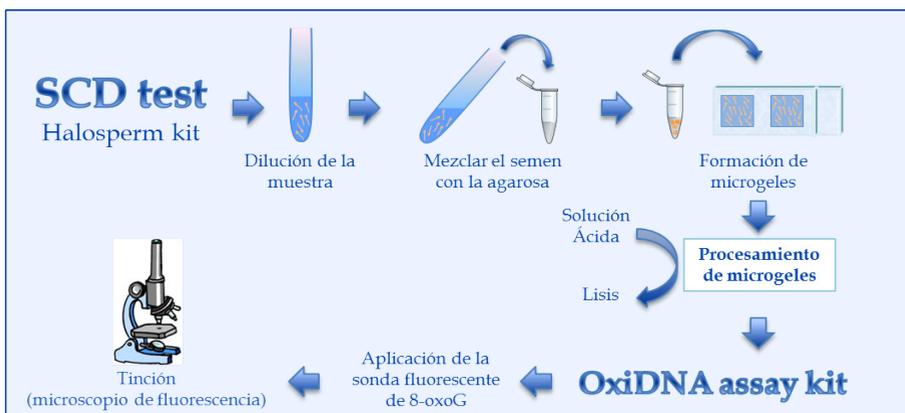


Figura 15. Esquema del protocolo para evaluar la SDF y la presencia de 8-oxoG de manera simultánea.

Tratamientos para dañar el ADN

Para validar el ensayo, se hicieron incubaciones *in vitro* de una muestra de un donante fértil con agentes que producen fragmentación en el ADN, acompañada o no por daño oxidativo en las bases del ADN. Para ello, se descongelaron varias alícuotas de la muestra y se lavaron y resuspendieron en PBS.

Se incubaron alícuotas de la muestra con dosis crecientes de H₂O₂ (0, 0,5, 1, 2, 5 mM) durante 60 min a 37°C. Tras la incubación, las alícuotas se lavaron y resuspendieron en PBS y se procesaron para el estudio de la fragmentación del ADN y la 8-oxoG con el kit Halosperm® y el kit *OxiDNA Assay*.

Otras alícuotas de la misma muestra se incubaron con dosis crecientes de nitroprusiato de sodio (SNP) (0, 5, 10, 25, 50 mM), un donante NO^{*}, durante 60 min a 37°C. Las alícuotas se lavaron y resuspendieron en PBS y a continuación se procesaron para el estudio de la fragmentación del ADN y la 8-oxoG con el kit Halosperm® y el kit *OxiDNA Assay*.

Otras alícuotas de la muestra se incubaron con desoxirribonucleasa pancreática bovina (DNasa I; Roche Applied Science, Barcelona, España). En este caso, los espermatozoides, previamente lavados y resuspendidos en PBS, se incluyeron en microgeles de agarosa sobre portaobjetos previamente gelificados. A continuación, las células espermáticas se permeabilizaron incubando con PBS - 0,5% Tritón X-100 durante 5 min a 37°C. Se lavaron dos veces en PBS durante 3 min y se incubaron en tampón de reacción de DNasa I (20 mM tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato [Tris-HCl], 2 mM MgCl₂, pH 8,3) durante 3 min a 37°C. Luego se incubaron con concentraciones crecientes de DNasa I (0, 0,5, 1,0 y 2,5 unidades, en 40µl de volumen final) durante 30 min a 37°C. Finalmente, los portaobjetos se lavaron cuatro veces en PBS durante 5 min y se procesaron con el kit Halosperm® y el kit *OxiDNA Assay* para estudiar la fragmentación del ADN y la 8-oxoG.

En estos experimentos, se colocaron varios microgeles con diferentes dosis del mismo agente en el mismo portaobjetos y se hicieron tres réplicas de cada experimento.

Microscopía de Fluorescencia y análisis digital de imagen

Los portaobjetos se examinaron a 100×, utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon E800 con filtros monocromáticos para DAPI y FITC para determinar la fragmentación del ADN y detectar la 8-oxoG, respectivamente, de forma simultánea.

Para estudiar la fragmentación del ADN con el test SCD, se establecieron cinco patrones de clasificación en relación al tamaño relativo del halo: (a) células espermáticas de halo grande: aquellas cuyo halo es de anchura similar o mayor al diámetro menor del core; (b) células espermáticas de halo mediano: el tamaño de su halo está entre las de halo grande y las de halo pequeño; (c) células espermáticas de halo pequeño: la anchura del halo es igual o menor a un tercio del diámetro menor del core; (d) células espermáticas sin halo; (e) células espermáticas degradadas - sin halo: similares a (d) pero con una tinción más suave o irregular. Las células espermáticas de halo pequeño, sin halo y degradadas - sin halo contienen ADN fragmentado. Se contaron un total de 500 espermatozoides por muestra.

Para estudiar la presencia de 8-oxoG, se establecieron dos patrones de clasificación: (a') células espermáticas no marcadas con la sonda de 8-oxoG: aquellas células que sólo presentaban un marcaje basal muy débil y (b') células espermáticas marcadas con la sonda de 8-oxoG: aquellas células que aparecían intensamente marcadas con la sonda de 8-oxoG. Además, se realizó un análisis de imagen para determinar la intensidad de la fluorescencia de cada uno de los tipos celulares. Para ello, se capturaron imágenes con una cámara CCD KX32ME refrigerada (Apogee Instruments, Roseville, CA). Se obtuvieron grupos de imágenes digitales de 16 bits y se guardaron en formato *tiff*. El análisis de imagen se llevó a cabo con el software Visilog 5.1 (Noesis, Gif sur Yvette, France), que permite sustraer el fondo y medir la intensidad de fluorescencia media dentro del área de interés en unidades arbitrarias.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 12.5 (SPSS Inc., Chicago, IL). El test de Kolmogorov-Smirnov determinó que todos los datos seguían una distribución normal. Para estudiar si existían diferencias

significativas en los porcentajes de SDF observados antes y después de realizar los diferentes tratamientos para dañar el ADN, se utilizó el test de la Chi-cuadrado. Se utilizó el test de Levene para estudiar la igualdad de varianzas y el test de la t de Student para las comparaciones entre los grupos de estudio. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. El nivel de significación se definió como $p < 0,05$.

* La preparación de las muestras de semen y las técnicas de reproducción asistida se llevaron a cabo en el Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia).

Objetivo 2.

Estudio de la matriz nuclear en células espermáticas con el ADN fragmentado.

Muestras

Para estudiar si existen diferencias en la matriz proteica nuclear entre espermatozoides con el ADN fragmentado y aquellos que no lo tienen, se utilizaron 20 muestras espermáticas, 4 procedentes de donantes fértiles normozoospermicos y 16 procedentes de pacientes infértiles que asistieron con sus parejas a la clínica Arggora-Unidad de la Mujer (A Coruña) para ser sometidos a tratamiento de infertilidad. De estos 16 pacientes infértiles, cinco eran normozoospermicos y once presentaban parámetros seminales anormales, según los criterios de la OMS (World Health Organization 1999). El rango de fragmentación de las muestras analizadas fue 5,13 - 48,00%.

Para estudiar si lo que ocurre en la matriz nuclear de células espermáticas con al ADN fragmentado es similar a lo que ocurre en células apoptóticas, se utilizó una muestra de sangre periférica. Para extraer los leucocitos de la sangre, se dejó reposar durante 1 h hasta que se formaron dos fases. Se seleccionó la fase superior, en la cual se encuentran los leucocitos, y se dejó a temperatura ambiente durante dos días para incrementar la proporción de células apoptóticas en la muestra.

Todos los pacientes que participaron en este estudio proporcionaron un consentimiento informado para utilizar las muestras, que de otro modo habrían sido descartadas.

Estudio de la matriz nuclear en células espermáticas con el ADN fragmentado y en leucocitos apoptóticos

Se diluyeron las muestras de espermatozoides a una concentración de 5 - 10 millones de espermatozoides/ml en PBS. Los leucocitos ya se encontraban a la concentración adecuada, así que no hizo falta diluirlos. A partir de aquí, tanto los espermatozoides como los leucocitos siguieron el mismo procesamiento. Se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión a 37°C para obtener una concentración final de 0,7% de agarosa. Se pipetearon 10µl

de la mezcla de semen-agarosa o leucocitos-agarosa sobre portaobjetos, previamente gelificados con agarosa al 0,65% y secados a 80°C, y se cubrieron con cubreobjetos de 18x18 mm. Se colocaron los portaobjetos sobre una placa fría en la nevera (4°C) durante 5 min para permitir que la agarosa formara un microgel con las células incluidas en su interior y, a continuación, se retiraron cuidadosamente los cubreobjetos. De esta manera, se prepararon cuatro réplicas a partir de cada muestra de espermatozoides o leucocitos y, tras retirar los cubreobjetos, se probaron diferentes protocolos para ver si alguno de ellos nos permitía estudiar de manera simultánea la fragmentación del ADN y la condición de la matriz nuclear (Figura 16).

En primer lugar, una réplica de las muestras se lisó con una solución de lisis fuerte. Para ello, inmediatamente después de retirar los cubreobjetos, se sumergió el portaobjetos en un recipiente con la solución de lisis fuerte (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,4 M ditioneitol [DTT]; 1% dodecilsulfato sódico [SDS]; 50 mM ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]; pH 7,5) durante 25 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron 5 min en agua destilada, se deshidrataron en baños crecientes de etanol (70 - 90 - 100%) durante 2 min y se dejaron secar al aire.

Otra réplica de las muestras se lisó con una solución de lisis suave, en la que se sustituyó el SDS de la lisis fuerte por Tritón X-100 y NaCl. En este caso, tras retirar los cubreobjetos, los portaobjetos se sumergieron en la solución de lisis suave (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,4 M DTT; 1% Tritón X-100; 2,5 M NaCl; 50 mM EDTA; pH 7,5) durante 25 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 5 min en agua destilada y se deshidrataron en baños crecientes de etanol (70 - 90 - 100%) durante 2 min. Se dejaron secar al aire.

A continuación, utilizando el kit Halosperm®, se sumergió un portaobjetos, con otra de las réplicas de las muestras, en una solución de HCl, que proporciona el kit, durante 7 min a temperatura ambiente (23°C) y, seguidamente, en una solución de lisis durante 25 min. Tras lavar durante 5 min en una cubeta con abundante agua destilada, se deshidrató la muestra, sumergiendo el portaobjetos en baños crecientes de etanol (70 - 90 - 100%) durante 2 min, y se dejó secar al aire.

Por último, una cuarta réplica de las muestras simplemente se deshidrató, sumergiendo el portaobjetos en baños crecientes de etanol (70 - 90 - 100%) durante 2 min, y se dejó secar al aire.

Cuando los portaobjetos estuvieron secos, se tiñó la proteína residual con mercuridibromofluoresceína (Merck, Darmstadt, Germany) (0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) durante 5 min. A continuación, se lavaron los portaobjetos en PBS para eliminar el exceso de fluorocromo y, finalmente, el ADN se tiñó con DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en Vectashield [Vector, Burlingame, CA]).

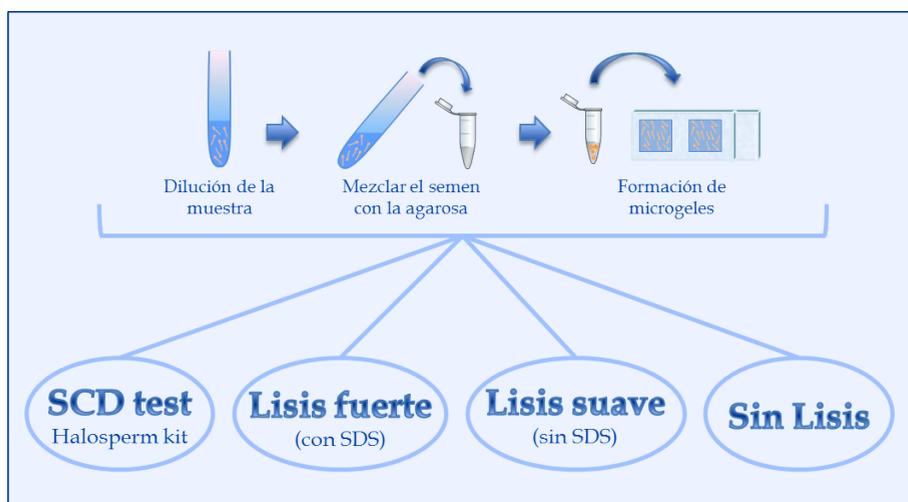


Figura 16. Esquema de los protocolos utilizados para evaluar la SDF y la matriz proteica nuclear de manera simultánea.

Estudio de la matriz nuclear en células espermáticas a las que se les induce fragmentación del ADN

Para estudiar la condición proteica en células a las que se les había inducido fragmentación en el ADN, se cultivaron cinco muestras de esperma a 37°C durante 48 h. El porcentaje de células con el ADN fragmentado aumentó de 10,6, 20,6, 26,5, 29,4 y 44,4, a 54,6, 50,5, 55,1, 61,9 y 79,4, respectivamente.

Microscopía de fluorescencia y análisis digital de imagen

Los portaobjetos se examinaron a 100 \times , utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon E800 con filtros monocromáticos para DAPI y mercuridibromofluoresceína para determinar la fragmentación del ADN y estudiar la condición proteica nuclear, respectivamente, de forma simultánea.

Para estudiar la fragmentación del ADN con el test SCD, tras utilizar el kit Halosperm[®], se establecieron cinco patrones de clasificación en relación al tamaño relativo del halo, como se explicó anteriormente (Material y Métodos, página 95). Se contaron un total de 500 espermatozoides por muestra.

Para estudiar la fragmentación del ADN tras lisar las muestras con la lisis fuerte y la lisis suave, se establecieron dos patrones de clasificación: (a) espermatozoides con el ADN intacto: presentan un halo de bucles de ADN alrededor de un core central y (b) espermatozoides con el ADN fragmentado: presentan grandes halos de fragmentos de cromatina que difunden alrededor de un core central. Se contaron un total de 500 espermatozoides por muestra.

Para estudiar la condición proteica nuclear, se capturaron imágenes con una cámara CCD KX32ME refrigerada (Apogee Instruments, Roseville, CA). Se obtuvieron grupos de imágenes digitales de 16 bits y se guardaron en formato *tiff*. La intensidad de fluorescencia se cuantificó con el software Visilog 5.1 (Noesis, Gif sur Yvette, France), que permite sustraer el fondo y medir la intensidad de fluorescencia media dentro del área de interés en unidades arbitrarias.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS 12.5 (SPSS Inc., Chicago, IL). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. Para las comparaciones entre grupos, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Las comparaciones múltiples se realizaron con el test de Kruskal-Wallis. En caso de resultar las diferencias estadísticamente significativas, se realizaron contrastes *a posteriori* para determinar entre qué muestras existían diferencias significativas. Para contrastar si existían diferencias significativas entre muestras apareadas, se usó el test de los rangos con signo de Wilcoxon. Todos los test se realizaron con un planteamiento bilateral. Se aceptó $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Objetivo 3.

Evaluación de la longitud media de la secuencia de ADN telomérico y su relación con la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos.

*Muestras de semen**

En este estudio, se utilizaron muestras de semen de 27 hombres que acudieron con sus parejas al Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia) para ser sometidas a tratamiento de infertilidad. Los pacientes proporcionaron consentimiento informado para utilizar sus muestras de semen para el análisis. De acuerdo con los criterios de la OMS (World Health Organization 1999), 2 pacientes eran normozoospermicos, 9 astenoteratozoospermicos y 16 teratozoospermicos. Las muestras de semen en las que se encontraron otros tipos celulares que no eran espermatozoides se descartaron porque podían influir en los resultados del tamaño telomérico.

Inmediatamente, tras obtener las muestras, una alícuota del semen fresco fue congelada en nitrógeno líquido, mientras que otra alícuota fue procesada por la técnica de *swim-up* para seleccionar la población de espermatozoides con mayor movilidad. En este caso, los eyaculados frescos se diluyeron con medio de cultivo HTF (LifeGlobal, Barcelona, España) en una proporción 1:1. Se centrifugaron a 400 g durante 10 min y se descartaron los sobrenadantes. Se añadió 0,5 - 1 ml de medio HTF fresco, sin alterar el pellet, y se incubó durante 45 min con una inclinación de 45°. Finalmente, se seleccionaron 0,1 - 0,5 ml de la parte superior del sobrenadante, que es donde se encuentran los espermatozoides más rápidos, y se congelaron en nitrógeno líquido.

Determinación de la fragmentación del ADN espermático

Inmediatamente, tras descongelar las muestras, se determinó la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado en el semen fresco y en los espermatozoides seleccionados por *swim-up*. Se hizo mediante el test SCD, utilizando el Kit Halosperm® (Halotech-DNA SL, Madrid, España). Las muestras se tiñeron con una mezcla de solución de tinción de Wright

(Merck, Darmstadt, Germany) y tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Germany), en una proporción 1:1, durante 10 - 15 min. Las muestras se examinaron en un microscopio de campo claro Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Germany) con un objetivo de 100×. Siempre que fue posible, se contaron un total de 500 espermatozoides por muestra. Algunas de las muestras de espermatozoides seleccionados por *swim-up* no tenían una concentración suficiente de células como para contar 500 espermatozoides. En estos casos, sólo se tuvieron en cuenta para el estudio aquellas muestras en las que se pudieron contar al menos 200 espermatozoides. La SDF se expresó como porcentaje de células espermáticas con el ADN fragmentado.

Medida de la longitud relativa del telómero por qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

Extracción y cuantificación del ADN de espermatozoides

La extracción del ADN de los espermatozoides del semen fresco y de los seleccionados por *swim-up* se realizó utilizando el sistema automatizado Magtration System 12CG (Precision System Science Co., Ltd., Matsudo, Chiba, Japan), usando los reactivos Magtration-MagaZorb DNA Common Kit-200 N. Este sistema se emplea para extraer ADN de células somáticas, por lo tanto, hubo que hacer una lisis previa, más fuerte, para eliminar las protaminas y poder extraer el ADN. Inmediatamente, tras descongelar las muestras, se colocaron 100 µl de espermatozoides en un tubo de 0,5 ml y se añadieron 100 µl de una solución de lisis (20 mM Tris-Cl, pH8; 20 mM EDTA; 200 mM NaCl; 4% SDS; 80 mM DTT; 0,3 mg/ml proteinasa K; el DTT y la proteinasa K se añadieron justo antes de utilizar la solución de lisis). Se incubó la muestra a 56°C con agitación durante 1 - 2 h. Tras la incubación con la lisis, se llevó a cabo la extracción del ADN espermático.

Una vez extraído el ADN, se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA).

qPCR

La longitud media del telómero de los espermatozoides, antes y después de *swim-up*, se cuantificó empleando la técnica validada de la PCR cuantitativa o qPCR (Cawthon 2002; Njajou *et al.* 2007). Este método mide, para cada

muestra, un ratio que relaciona la amplificación de la cantidad de ADN telomérico con respecto a la amplificación de un gen de copia única (en nuestro caso, el gen 36B4, que codifica para una fosfoproteína ribosómica ácida y que está localizado en el cromosoma 12). A este ratio se le denomina Ratio T/S (T de telómero en inglés, *telomere*; S de gen de copia única en inglés, *single gen*) y es proporcional a la longitud relativa del telómero.

La técnica de la qPCR se llevó a cabo usando un termociclador LightCycler (LightCycler 480, Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada) en un formato de 96 pocillos. Las muestras fueron amplificadas por duplicado y en paralelo para el telómero y el 36B4. La composición de las reacciones de PCR fue la misma para el telómero y para el 36B4, excepto por los cebadores. Se prepararon a un volumen final de 20 μ l e incluyeron: 1x LightCycler® 480 Sybr Green I Master (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada), 30 ng de ADN, agua y los cebadores específicos para el telómero (telómero *forward*: 5'-CGGTTTGTGGGGTTTGGGGTTTGGGGTTTGGGGTTTGGGGTT-3', telómero *reverse*: 5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3') o para el gen 36B4 (36B4 *forward*: 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3', 36B4 *reverse*: 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3') a una concentración de 500 nM.

La placa es selló con adhesivo y se centrifugó brevemente a 750g. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C durante 10 min, 45 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 10 segundos. La especificidad de todas las amplificaciones se determinó mediante el análisis de las curvas de *melting*: un ciclo a 95°C durante 5 segundos, 70°C durante 1 minuto y un último ciclo a 40°C durante 30 segundos.

La técnica fue optimizada mediante la realización de curvas estándar, usando diluciones seriadas de un ADN de referencia en cada ensayo de PCR realizado. El coeficiente de correlación lineal (R^2) para cada curva estándar fue $> 0,99$ tanto para las curvas estándar del telómero como para las del gen 36B4. La eficiencia media de la reacción, calculada a partir de la pendiente de las curvas lineales, fue de 1,8 para la amplificación del telómero y de 1,9 para la amplificación del gen 36B4. El ratio T/S se calculó empleando los valores de eficiencia obtenidos para cada reacción de PCR: $\text{Ratio T/S} = \text{Eficiencia}^{-Cq_{\text{Tel}}} / \text{Eficiencia}^{-Cq_{36B4}}$. Los coeficientes de variación entre los diferentes ensayos fueron de 2,4% para el telómero y de 0,9% para el gen 36B4. Para evitar que estas variaciones entre ensayos afectaran a las

muestras apareadas de cada individuo (semén fresco y espermatozoides seleccionados por *swim-up*), éstas se introdujeron en la misma placa de PCR, cada una por duplicado.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL). El test de Kolmogorov – Smirnov demostró que los porcentajes de espermatozoides con el ADN fragmentado en las muestras de semén fresco y los datos de longitud de telómero seguían una distribución normal. Sin embargo, la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado en las muestras seleccionadas por *swim-up* no siguió una distribución normal. Para comparar la SDF entre las muestras de semén fresco y las muestras seleccionadas por *swim-up*, se utilizó el test de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras apareadas. Para comparar la longitud del telómero entre las muestras de semén fresco y las muestras seleccionadas por *swim-up*, se utilizó el test de la t de Student para muestras apareadas. Para estudiar si existía alguna correlación entre la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado y la longitud del telómero, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. Se aceptó $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

* La preparación de las muestras de semén se llevó a cabo en el Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia).

Objetivo 4.

Estudio del efecto del cáncer sobre la fragmentación del ADN espermático.

*Muestras**

Se obtuvieron muestras de pacientes con cáncer que acudieron, entre enero del 2003 y marzo del 2007, al Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia) para criopreservar sus muestras de semen, obteniendo un total de 75 muestras. Se excluyeron los pacientes que ya habían recibido alguna sesión de quimio o radioterapia antes de congelar la muestra. Los datos considerados en los pacientes con cáncer fueron: edad, parámetros espermáticos y tipo de cáncer.

Además del grupo de pacientes con cáncer, se seleccionó un grupo control de donantes fértiles de esperma (n = 50) y un grupo de pacientes que se estaban sometiendo con sus parejas a algún tratamiento de infertilidad (n = 166). Este último grupo se dividió en dos, en base a si conseguían embarazo en el primer intento de reproducción asistida.

Se examinó la concentración y la movilidad de las muestras de semen en una cámara Mackler® (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) de acuerdo con los criterios de la OMS (World Health Organization 1999). Las muestras de semen se congelaron añadiendo gota a gota un crioprotector a base de glicerol (Sperm Freezing Medium; Medicult Company, Jyllinge, Denmark) mientras se encontraban en agitación continua. Tras una incubación corta de 10 min a temperatura ambiente, la muestra se transfirió gota a gota a una superficie de hielo seco, en la cual se habían hecho pequeños agujeros (aproximadamente 50 ml) (Meseguer *et al.* 2006). Dos min después, cuando el semen ya estaba completamente congelado, se separó una alícuota de cada muestra de semen congelada en pastillas (10 - 100µl) para realizar este estudio. Se transfirió a un criotubo y se sumergido en nitrógeno líquido.

Este estudio fue aprobado por una junta de revisión institucional para el uso de muestras humanas en investigación del Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia). Las muestras seminales para investigación se obtuvieron tras un consentimiento informado de los pacientes.

Determinación de la fragmentación del ADN espermático

La determinación de la SDF se hizo mediante el test SCD, utilizando el kit Halosperm® (Halotech-DNA SL, Madrid, España).

Para teñir las muestras, se colocaron los portaobjetos horizontalmente y se cubrieron con una mezcla de solución de tinción de Wright (Merck, Darmstadt, Germany) y tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Germany) en una proporción 1:1, durante 10 - 15 min. A continuación, se lavaron los portaobjetos brevemente con agua del grifo y se dejaron secar al aire. Las muestras se examinaron en un microscopio de campo claro Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Germany) con un objetivo de 100x.

Se contaron un total de 500 espermatozoides por muestra. La SDF se expresó como porcentaje de células espermáticas con el ADN fragmentado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Para las comparaciones *a posteriori* se utilizó el test de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo $p < 0,05$. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante paquete estadístico SPSS 12.5 (SPSS Inc., Chicago, IL).

* La preparación de las muestras de semen se llevó a cabo en el Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia).

Objetivo 5.

Estudio del efecto de la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* sobre la fragmentación del ADN espermático.

*Muestras**

Se reunieron muestras de semen de 143 hombres diagnosticados de infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, que acudieron con sus parejas a un centro de medicina reproductiva asociado a la Universidad Autónoma de Nuevo León (Nuevo León, México) para ser sometidas a tratamiento de fertilidad. El rango de edad de los pacientes osciló entre los 25 y los 51 años ($34,9 \pm 5,4$), con $5,0 \pm 3,9$ años de infertilidad. El efecto de la terapia con antibióticos se evaluó en 95 de los 143 pacientes con infección genitourinaria. El grupo control se constituyó con muestras de 50 donantes fértiles.

Las muestras de semen fueron obtenidas por masturbación tras 2 - 3 días de abstinencia. Tras la licuefacción de los eyaculados, el análisis del semen se hizo siguiendo las directrices estándar de la OMS (World Health Organization 1999).

Las muestras de semen se congelaron en nitrógeno líquido hasta que fueron procesadas para la determinación de la SDF.

Los pacientes proporcionaron consentimiento informado para utilizar sus muestras de semen para el análisis.

*Análisis microbiológico del semen y terapia con antibióticos**

La presencia de *Chlamydia trachomatis* fue estudiada en frotis uretral o en pellet seminal por inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales, utilizando el kit comercial MicroTrack (Trinity Biotech, Wicklow, Ireland), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit Mycoplasma IST (Biomerieux, Lyon, France) se utilizó para el cultivo de fluidos seminales. Este método permite detectar y cuantificar la

concentración de estos microorganismos y su susceptibilidad a determinados antibióticos.

Como la sensibilidad de *Chlamydia trachomatis* a los antibióticos es generalmente similar a la de *Mycoplasma sp.*, la terapia antibiótica fue elegida considerando el antibiograma del cultivo de *Mycoplasma sp.* y la tolerancia del paciente. Dependiendo de cada caso, se utilizó un macrólido, una tetraciclina o una quinolona, durante un período dependiente de la evolución de los síntomas y del seguimiento del laboratorio.

Evaluación de la fragmentación del ADN

La determinación de la SDF se hizo mediante el test SCD, utilizando el kit Halosperm® (Halotech-DNA SL, Madrid, España). Para teñir las muestras, se colocaron los portaobjetos horizontalmente y se cubrieron con una mezcla de solución de tinción de Wright (Merck, Darmstadt, Germany) y tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Germany), en una proporción 1:1, durante 10 - 15 min. A continuación, se lavaron los portaobjetos brevemente con agua del grifo y se dejaron secar al aire. Las muestras se examinaron en un microscopio de campo claro Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Germany) con un objetivo de 100×. Se contaron 500 espermatozoides por muestra. La SDF se expresó como porcentaje de células espermáticas con el ADN fragmentado.

Procedimientos de reproducción asistida*

Algunas parejas intentaron obtener un embarazo tanto de modo natural (sin protección ni estimulación ovárica o técnica de reproducción asistida) como mediante IUI. En este último caso, el esperma lavado se preparó diluyendo el semen con 3 - 5 volúmenes de medio de cultivo HTF (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) suplementado con 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA). El semen diluido se centrifugó a 400 g durante 15 min a temperatura ambiente. El pellet del esperma se resuspendió en 0,5 ml de medio de cultivo HTF y fue seleccionado por la técnica de *swim-up*.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, IL). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. El test de Kolmogorov-Smirnov verificó que la muestra no se distribuía de forma normal. Para comparar los parámetros seminales y los porcentajes de SDF entre el grupo de donantes fértiles y el grupo de pacientes, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Para comparar los parámetros seminales y los porcentajes de SDF en el grupo de pacientes, antes y después de la terapia con antibióticos, se usó el test de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras apareadas. Para estudiar si existían correlaciones significativas entre los parámetros seminales y los porcentajes de SDF dentro de los diferentes grupos, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ). La relación entre la evolución de la enfermedad y el resultado en fertilidad se estudió mediante el test de la χ^2 de Pearson y el coeficiente de correlación de Spearman. Para comparar los valores de los parámetros seminales y los porcentajes de SDF entre el grupo que consiguió embarazo y el que no, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se aceptó $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

* La preparación de las muestras de semen, el análisis microbiológico y las técnicas de reproducción asistida se llevaron a cabo en el Centro de Medicina Reproductiva de la Universidad de Nuevo Leon, México.

Objetivo 6.

Cuantificación del efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre el resultado en reproducción asistida.

Población de estudio

Se reunieron muestras de espermatozoides de un total de 210 hombres cuyas parejas se sometieron a FIV o ICSI entre Enero y Septiembre de 2009. Se establecieron los siguientes criterios de inclusión: mujeres con una edad comprendida entre los 30 y los 45 años que se estuvieran sometiendo a su primer ciclo de FIV y con un índice de masa corporal inferior a 30 Kg/m². Los criterios de exclusión fueron: presencia de alguna patología uterina (adenomiosis o disfunciones uterinas), disfunciones endocrinas o metabólicas significativas, aborto recurrente y oligospermia severa (menos de 1 millón de espermatozoides/ml).

Este estudio fue aprobado por una junta de revisión institucional para el uso de muestras humanas en investigación del Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia). Las muestras seminales para investigación se obtuvieron tras un consentimiento informado de los pacientes.

*Muestras de semen**

Para este estudio, se analizaron muestras de semen fresco (n = 153) o congelado (n = 57), utilizadas en FIV (n = 28) o ICSI (n = 182), con ovocitos propios (n = 98) o donados (n = 112), de un total de 210 pacientes.

Se analizaron un total de 420 muestras, ya que, de cada uno de los pacientes, se analizó una muestra de semen antes de la selección de espermatozoides para su uso en reproducción asistida y otra muestra después de la selección por *swim-up*.

Las muestras de semen se congelaron en nitrógeno líquido hasta que fueron procesadas para la determinación de la SDF.

Determinación de la fragmentación del ADN espermático.

Inmediatamente, tras descongelar las muestras, se determinó la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado en el semen fresco (n = 210) y en los espermatozoides seleccionados por *swim-up* (n = 210). Se hizo mediante el test SCD, utilizando el Kit Halosperm® (Halotech-DNA SL, Madrid, España). Las muestras se tiñeron con una mezcla de solución de tinción de Wright (Merck, Darmstadt, Germany) y tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Germany), en una proporción 1:1, durante 10 - 15 min. Las muestras se examinaron en un microscopio de campo claro Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Germany) con un objetivo de 100×. Siempre que fue posible, se contaron un total de 500 espermatozoides por muestra. En el caso de las muestras de espermatozoides seleccionados por *swim-up* que no tenían la suficiente concentración de células, sólo se tuvieron en cuenta aquellas en las que se pudieron contar al menos 200 espermatozoides. La SDF se expresó como porcentaje de células espermáticas con el ADN fragmentado.

Estimulación ovárica y técnicas de inseminación de ovocitos*

La estimulación ovárica controlada y la inseminación de los ovocitos recuperados se llevó a cabo según los procedimientos habituales de inseminación por FIV o con técnicas de micromanipulación (ICSI) (Meseguer *et al.* 2003), utilizando espermatozoides seleccionados por *swim-up*. Se estudiaron un total de 182 primeros ciclos de ICSI y 28 primeros ciclos de FIV, empleando ovocitos de donantes (n = 112) y ovocitos propios (n = 98). El embarazo clínico se confirmó, mediante ecografía, cuando se detectó el saco gestacional con latido fetal a las 7 semanas. El aborto se determinó cuando un embarazo no logró llegar a la semana 22 tras la detección del saco gestacional.

Análisis Estadístico

Para evaluar el efecto de la SDF sobre la probabilidad de obtener embarazo, utilizando la calidad del ovocito como un factor de sesgo, se llevó a cabo un análisis estratificado. De esta manera, se definieron dos grupos: un grupo en el que se utilizaron ovocitos de donantes (población homogénea de mujeres jóvenes y fértiles) y otro grupo en el que se utilizaron los ovocitos propios de

las pacientes. El procedimiento utilizado para la fecundación (FIV o ICSI) y el origen del semen (fresco o congelado) se consideraron como posibles factores de confusión en ambos grupos, y esto se evaluó antes y después de *swim-up*. Los factores de confusión se estudiaron siguiendo dos criterios; por un lado, se estudió la relación estadística entre estos factores y el embarazo y, por otro lado, se estudió la relación de estos factores con la SDF. Estas relaciones se evaluaron mediante un test de Chi-cuadrado o un test de Fisher (cuando el tamaño muestral era reducido) y un test T o de Mann-Whitney (cuando la distribución no era normal o $n < 30$) ($p < 0,05$). Estos factores también fueron analizados mediante regresión logística para determinar cómo modificaban el efecto de la SDF sobre la tasa de embarazo. De esta manera, se creó una nueva variable que representaba la interacción del origen del semen (fresco o congelado) o el procedimiento de fecundación (FIV o ICSI) con la SDF. Las variables obtenidas se incluyeron en el análisis (método Wald) y las que tenían p valores $> 0,05$ no fueron consideradas como modificadoras de dicho efecto. Tras este análisis estadístico, las variables en cuestión fueron clasificadas como aquellas que confunden o modifican, de manera estadísticamente significativa, el efecto de la SDF sobre los parámetros considerados en el estudio.

Con los resultados del análisis estratificado, se definió un modelo de regresión logística para cuantificar el efecto de la SDF, evaluada antes y después de *swim-up*, sobre la probabilidad de conseguir un embarazo. En este modelo, se excluyeron aquellos factores que no fueron considerados como modificadores del efecto. Se repitió el mismo análisis para estudiar el efecto de la SDF sobre la probabilidad de sufrir un aborto. La razón de probabilidades (OR; *Odds Ratio*) del efecto del incremento de una unidad de SDF sobre el embarazo y el aborto se expresó en términos de intervalos de confianza del 95% (IC 95%) y significación. La significación se calculó utilizando la razón de verosimilitud, y las incertidumbres reveladas por el modelo se evaluaron por la R^2 de Nagelkerke, un coeficiente que es análogo al índice R^2 del análisis de regresión lineal. Las curvas ROC (*receiver operating characteristic*) se emplearon para establecer el valor predictivo de la SDF con respecto a la obtención de embarazo. El análisis de la curva ROC proporciona valores del área por debajo de la curva (AUC) que están comprendidos entre 0,5 y 1 y pueden ser interpretados como una medida de la habilidad de clasificación global del modelo. Cuando se determina el poder predictivo de un test clínico, un valor de AUC $> 0,8$ se considera aceptable. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete

estadístico SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL) y el software MedCalc (Ghent, Bélgica).

* La preparación de las muestras de semen y las técnicas de reproducción asistida se llevaron a cabo en el Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia).

Objetivo 7.

Evaluación de la dinámica de la fragmentación del ADN espermático como indicador en toxicología reproductiva.

Población de estudio

Se reunieron muestras de semen de 11 donantes fértiles (A - K), normozoospermicos, de acuerdo con los criterios de la OMS (World Health Organization 1999). Las muestras se obtuvieron tras un consentimiento informado de los donantes.

Efecto de la radiación ionizante

Las muestras de semen de tres de los donantes (A - C) se distribuyeron en alícuotas, en jeringuillas de insulina estériles (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Inmediatamente, se expusieron en una unidad de radioterapia Clinac 2100 C/D (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA) a diferentes dosis de rayos-X de 6 MeV: 0, 0,5, 1, 2, 5 y 10 Gy, a 6,6 Gy/min. Después, se incubaron las muestras a 37°C durante 24 h. Además, otras alícuotas del semen irradiado se incubaron a 45°C durante 24 h. Se recogieron alícuotas de las muestras a las 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h para determinar el porcentaje de SDF.

Efecto de la hipertermia

Para estudiar el efecto de la hipertermia, se expusieron *in vitro* muestras de semen de otros tres donantes (D - F) a elevadas temperaturas.

Para inducir una exposición crónica, se incubaron alícuotas de las muestras a 41°C y 45°C en un baño de agua durante 24 h. Otra alícuota de cada una de estas muestras se incubó a 37°C, como control del experimento. Se recogieron alícuotas a 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h para determinar el porcentaje de SDF.

Para inducir una exposición aguda, el semen fue incubado a 41°C y a 45°C durante 1 h y, después, a 37°C durante 24 h. Al igual que en el experimento anterior, se incubó otra alícuota de cada una de las muestras a 37°C, como

control del experimento. Para estudiar el porcentaje de SDF, se recogieron alícuotas a los mismos tiempos de incubación que en el experimento anterior, empezando a contar el tiempo 0 justo después de la incubación aguda de 1 h a alta temperatura.

Efecto del pH ácido

Para estudiar el efecto del pH ácido, se utilizaron muestras de semen de dos donantes (G, H).

Par inducir un tratamiento crónico, el pH de una alícuota de cada una de las muestras se bajó hasta 4, añadiendo, gota a gota, una solución de ácido cítrico (1,5 M; pH 1,34) y se incubó a 37°C durante 24 h. Otra alícuota de estas muestras fue procesada de la misma manera, pero sin cambiar su pH (pH 8), como control del experimento. Se recogieron alícuotas de las muestras a 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h para determinar el porcentaje de SDF.

Para inducir una exposición aguda a un ambiente ácido, se bajó el pH de una alícuota de cada una de las muestras hasta 4, de la misma manera que en el experimento anterior y se incubó a 37°C durante 1 h. A continuación, se lavó y se resuspendió la muestra en PBS (pH 7) y se incubó a 37°C durante 24 h. Otra alícuota de cada una de las muestras se procesó exactamente igual, pero sin cambiar su pH inicial, para ser utilizada como control del experimento. Se recogieron alícuotas tras los mismos tiempos de incubación que antes para estudiar el porcentaje de SDF. Se empezó a contar el tiempo 0 justo después de la incubación aguda de 1 hora.

Efecto del óxido nítrico

Para evaluar el efecto del NO*, se incubaron muestras de semen de tres donantes (I - K) con dosis crecientes de SNP, un donante de NO*.

Para inducir una exposición crónica, se incubaron alícuotas de las muestras con 0, 5, 10, 25 y 50 mM de SNP a 37°C durante 24 h. Se recogieron alícuotas a 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h para determinar el porcentaje de SDF.

Para inducir una exposición aguda, se incubó el semen con las mismas dosis de SNP, pero sólo durante 5 min. A continuación, se lavaron y se

resuspendieron las muestras en PBS y se incubaron a 37°C durante 24 h. Se recogieron alícuotas tras los mismos tiempos de incubación que antes, empezando a contar el tiempo 0 justo después de la incubación aguda de 5 min con SNP.

Las incubaciones en todos los experimentos se realizaron en oscuridad. Esto es especialmente importante en el caso del SNP, ya que es sensible a la luz.

Determinación de la fragmentación del ADN espermático

El análisis de la SDF se hizo mediante el test SCD, utilizando el Kit Halosperm® (Halotech-DNA SL, Madrid, España). Las muestras se tiñeron con una mezcla de solución de tinción de Wright (Merck, Darmstadt, Germany) y tampón fosfato (Merck, Darmstadt, Germany), en una proporción 1:1, durante 10 - 15 min. Las muestras se examinaron en un microscopio de campo claro Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Germany) con un objetivo de 100×. Se contaron un total de 500 espermatozoides por muestra. La SDF se expresó como porcentaje de células espermáticas con el ADN fragmentado.

Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron utilizando el paquete de software para Windows, SPSS 19 (IBM; Armonk, NY).

En el caso de los tratamientos crónicos, para evaluar si los agentes estudiados afectaban a la SDF a lo largo del tiempo, se utilizaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier; este análisis indica las nuevas células que aparecen fragmentadas tras cada tiempo de incubación. Las curvas se compararon utilizando la prueba de Mantel-Cox (*logrank*).

En el caso de los tratamientos agudos, se hicieron dos tipos de análisis: Por un lado, nos interesó saber si la exposición aguda al tratamiento afectaba a la SDF. Para ello, se compararon los porcentajes de SDF que presentaban las muestras justo después del tratamiento agudo, utilizando una Chi-cuadrado. Por otro lado, quisimos saber si el tratamiento agudo modificaba la dinámica de la SDF (cuando la muestra ya no estaba expuesta al tratamiento). Para ello, se utilizó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, y las curvas se

compararon utilizando la prueba de Mantel-Cox (*logrank*). Se empezó a contar el tiempo 0 justo después de la exposición aguda al agente. Durante el análisis, se observó que algunas muestras espermáticas presentaban dinámicas similares, pero tenían diferentes valores iniciales de SDF debido a que las diferentes dosis del tóxico no afectaron de la misma manera a la muestra. En estos casos, el test podría haber indicado diferencias significativas en las cinéticas que no serían reales. Para evitar este problema, las dinámicas de la SDF se relativizaron restando la SDF inicial (% SDF justo después de la incubación aguda con el tóxico) en cada tiempo de incubación, partiendo así de una supervivencia inicial del 100% en todos los casos.

Para las comparaciones entre individuos, se utilizó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y la prueba de Mantel-Cox (*logrank*). Tanto en el caso de los tratamientos crónicos como en el caso de los tratamientos agudos, fue necesario relativizar las dinámicas para evitar la influencia de la SDF basal (en el caso de los tratamientos crónicos) o la influencia de la SDF que resultó justo después del tratamiento agudo con el tóxico.

La significación se definió como $p < 0,05$.

Resultados y Discusión



Objetivo 1.

Estudio de la relación entre la fragmentación y la presencia de 8-oxoG en el ADN de espermatozoides humanos.

Desarrollo de un ensayo que permita detectar de manera simultánea la fragmentación del ADN espermático y la hidroxilación de la guanina en muestras de espermatozoides

La hidroxilación de la guanina en el carbono 8 es una de las modificaciones más frecuentes en el ADN del espermatozoide humano y se considera un marcador de daño oxidativo (Kasai 1997). Durante la replicación, la polimerasa la pasa por alto fácilmente, lo que la convierte en una lesión altamente mutagénica (Hazra *et al.* 2001). En estudios recientes, varios autores (Moustafa *et al.* 2004; De Iuliis *et al.* 2009; Thomson *et al.* 2011) han observado una correlación significativa entre la SDF y la presencia de 8-oxoG, lo cual los ha llevado a concluir que el daño oxidativo podría ser el mayor contribuyente a la fragmentación del ADN observada en los espermatozoides humanos. Hasta ahora, nunca se había estudiado la SDF y la presencia de 8-oxoG de manera simultánea, es decir, en la misma célula, y esto es algo que, sin duda, nos ayudará a establecer una relación clara entre ambos sucesos y a esclarecer el origen de la fragmentación del ADN observada en la línea germinal.

Para desarrollar este ensayo, se aplicó una sonda fluorescente de 8-oxoG en células espermáticas, de un donante fértil, que ya habían sido procesadas con el test SCD para la determinación de la fragmentación del ADN (Fernández *et al.* 2005b). En estas células, observamos que la población de espermatozoides con el ADN fragmentado (13,5%), es decir, las células con halo pequeño o sin halo, estaban fuertemente marcadas por la sonda de 8-oxoG (Tabla 1; Figura 17a, a'), con una intensidad de fluorescencia de $112,2 \pm 54,7$ unidades arbitrarias (ua). La intensidad de fluorescencia fue 4,7 veces más alta que la de los espermatozoides que no tenían el ADN fragmentado ($23,9 \pm 16,4$ ua) ($p < 0,01$).

Para determinar la habilidad y la especificidad para detectar la 8-oxoG en células espermáticas procesadas con el test SCD, la misma muestra de espermatozoides se incubó *in vitro* con diferentes agentes que producen fragmentación del ADN, acompañada o no por daño oxidativo en las bases del ADN. Una alícuota de la muestra se trató con dosis crecientes de H₂O₂ (0,5 mM, 1 mM, 2 mM y 5 mM), el cual se descompone en radicales •OH, que a su vez son potentes oxidantes. El ataque de los radicales •OH puede dar lugar a roturas en la cadena de ADN con diferentes modificaciones en los azúcares y sitios abásicos (von Sonntag 1984; Breen & Murphy 1995). Además, los radicales •OH también producen un amplio espectro de

modificaciones oxidativas en las bases del ADN, especialmente 8-oxoG (Breen & Murphy 1995; Kasai 1997). De esta manera, la incubación con H₂O₂ debería dar lugar a SDF y 8-oxoG en la misma célula y, efectivamente, esto fue lo que se observó (Tabla 1). Por un lado, la incubación con H₂O₂, durante 1 hora, produjo un aumento significativo de la SDF con respecto al control en todas las dosis estudiadas ($p < 0,01$) (Tabla 1). Además, se observó un intenso marcaje de 8-oxoG en las células espermáticas que tenían el ADN fragmentado, similar al de las células con el ADN fragmentado del control ($143,7 \pm 91,4$ ua). Este marcaje fue más fuerte cuanto mayor era la dosis aplicada, alcanzando una intensidad de $269,9 \pm 123,0$ ua en la dosis más alta (5 mM) (Figura 17b, b').

H ₂ O ₂		Halo Grande	Halo Mediano	Halo Pequeño	Sin Halo	Sin Halo y Degradadas	Fragmentación
Control	SCD	85,0	1,5	2,0	10,0	1,5	13,5
	8-oxoG	0,0	0,0	2,0	9,5	1,0	12,5
0,5 mM	SCD	8,1	15,8	37,8	36,6	1,7	76,1
	8-oxoG	0,0	0,0	37,8	36,6	0,9	75,3
1 mM	SCD	0,0	0,0	5,4	92,1	2,5	100,0
	8-oxoG	0,0	0,0	5,4	92,1	0,8	98,3
2 mM	SCD	0,0	0,0	0,0	97,2	2,8	100,0
	8-oxoG	0,0	0,0	0,0	97,2	2,8	100,0
5 mM	SCD	0,0	0,0	0,0	94,5	5,5	100,0
	8-oxoG	0,0	0,0	0,0	94,5	5,5	100,0

Tabla 1. Porcentajes de los diferentes tamaños de halo obtenidos mediante el test SCD y de células marcadas intensamente con la sonda de 8-oxoG en una muestra espermática expuesta a diferentes dosis de H₂O₂ (60 min a 37°C). Las células espermáticas con el ADN fragmentado son las de halo pequeño, las sin halo y las sin halo y degradadas.

Otra alícuota de la muestra se incubó *in vitro* con SNP (5 mM, 10 mM, 25 mM y 50 mM). El SNP se descompone produciendo NO•, el cual es inestable en presencia de oxígeno molecular, reaccionando para formar agentes nitrosantes, principalmente anhídrido nitroso (N₂O₃), que puede causar estrés nitrosativo. A parte de esto, el NO• también reacciona con ROS, como

el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), para dar peroxinitrito ($ONOO^-$), cuyo poder oxidante es comparable en reactividad al del NO^\bullet . En general, los estudios químicos sugieren que, a través del N_2O_3 y el $ONOO^-$, el NO^\bullet liberado por el SNP puede inducir, principalmente, roturas en el ADN y sitios abásicos, y, predominantemente, lesiones en los residuos de guanina (Caulfield *et al.* 1998; Burney *et al.* 1999; Grishko *et al.* 1999). Este agente forma entre 100 y 1000 veces más cantidad de 8-nitroguanina que de 8-oxoG (Szabo & Ohshima 1997; D'Ambrosio *et al.* 2001). Por consiguiente, y a diferencia del H_2O_2 , los espermatozoides incubados con SNP deberían mostrar fragmentación del ADN, pero con una producción limitada de 8-oxoG. De hecho, éste fue el caso, ya que, tras la incubación con SNP, se observó un incremento significativo ($p < 0,01$) en la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado (Tabla 2). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría con el H_2O_2 , la mayor parte de las células que se marcaron intensamente con la sonda de 8-oxoG fueron las que ya tenían el ADN fragmentado antes del tratamiento con SNP. Sólo con las dosis más altas de SNP, se observó un incremento significativo, aunque muy leve, en el marcaje de 8-oxoG ($42,1 \pm 13,3$ ua) en esas células con el ADN fragmentado (Fig. 17c, c').

SNP		Halo Grande	Halo Mediano	Halo Pequeño	Sin Halo	Sin Halo y Degradadas	Fragmentación
Control	SCD	85,0	1,5	2,0	10,0	1,5	13,5
	8-oxoG	0,0	0,0	2,0	9,5	1,0	12,5
5 mM	SCD	60,9	4,6	4,6	21,6	8,3	34,5
	8-oxoG	0,0	0,0	1,0	11,0	2,0	14,0
10 mM	SCD	42,1	8,5	8,1	35,7	5,6	49,4
	8-oxoG	0,0	0,0	1,0	12,0	1,0	14,0
25 mM	SCD	4,2	13,5	31,5	45,8	4,9	82,2
	8-oxoG	0,0	0,0	5,0	16,0	2,0	23,0
50 mM	SCD	0,0	0,0	32,2	66,4	1,4	100,0
	8-oxoG	0,0	0,0	2,0	18,0	3,0	23,0

Tabla 2. Porcentajes de los diferentes tamaños de halo obtenidos mediante el test SCD y de células marcadas intensamente con la sonda de 8-oxoG en una muestra espermática expuesta a diferentes dosis de SNP (60 min a 37°C). Las células espermáticas con el ADN fragmentado son las de halo pequeño, las sin halo y las sin halo y degradadas.

Por último, se incubó otra alícuota de la muestra con DNasa I. La DNasa I rompe enzimáticamente los puentes fosfodiéster (Sambrook *et al.* 1989). La incubación de espermatozoides con DNasa I debería producir roturas en el ADN sin ningún tipo de daño oxidativo. De acuerdo con lo esperado, tras la incubación con DNasa I, la fragmentación aumentó significativamente ($p < 0,01$) en todas las dosis estudiadas, pero no se produjo un incremento en el marcaje de 8-oxoG ($14,9 \pm 12,8$ ua) (Tabla 3; Figura 17d, d'). Además, no se encontró ninguna célula espermática significativamente marcada con 8-oxoG, ni siquiera esa población de células que antes del tratamiento con DNasa I ya tenían el ADN fragmentado y se marcaban intensamente con la sonda de 8-oxoG. Esto podría ser consecuencia de una pérdida de ADN, ya que la DNasa I estaría induciendo nuevas roturas sobre el ADN de núcleos espermáticos que previamente ya contenían roturas masivas de ADN.

DNasa		Halo Grande	Halo Mediano	Halo Pequeño	Sin Halo	Sin Halo y Degradadas	Fragmentación
Control	SCD	85,0	1,5	2,0	10,0	1,5	13,5
	8-oxoG	0,0	0,0	2,0	9,5	1,0	12,5
0,5 U	SCD	0,0	23,3	47,0	28,7	1,0	76,7
	8-oxoG	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1 U	SCD	0,0	3,0	46,7	47,0	3,3	97,0
	8-oxoG	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2,5 U	SCD	0,0	0,0	4,7	86,6	8,7	100,0
	8-oxoG	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla 3. Porcentajes de los diferentes tamaños de halo obtenidos mediante el test SCD y de células marcadas intensamente con la sonda de 8-oxoG en una muestra espermática expuesta a diferentes dosis de DNasa (30 min a 37°C). Las células espermáticas con el ADN fragmentado son las de halo pequeño, las sin halo y las sin halo y degradadas.

Los resultados de las incubaciones *in vitro* concuerdan con lo esperado, validando así el procedimiento técnico para estudiar de manera simultánea daño oxidativo y fragmentación del ADN, en células espermáticas.

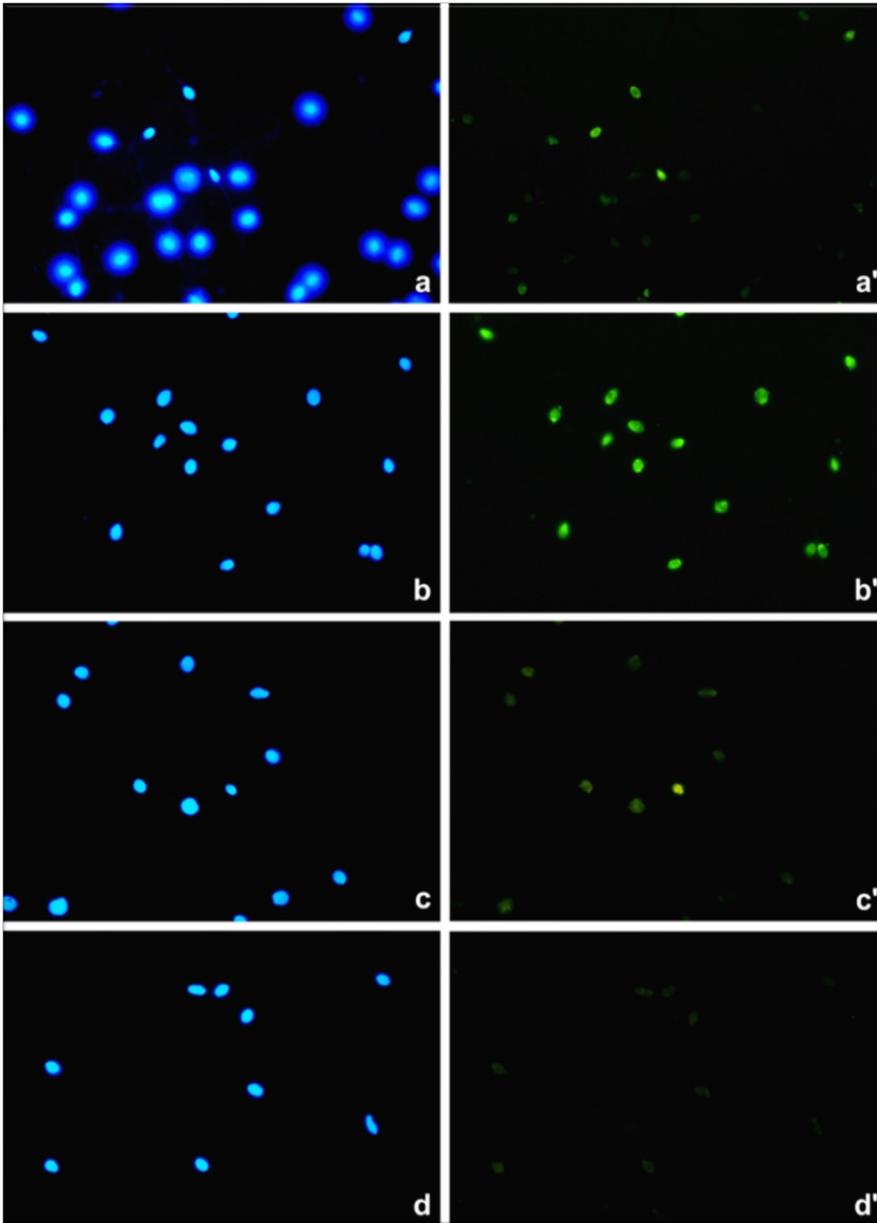


Figura 17. Células espermáticas de un donante fértil incubadas con agentes que inducen SDF, para el estudio simultáneo de la SDF (izquierda, tinción DAPI azul) y la presencia de 8-oxoG (derecha, marcaje FITC verde). Por motivos ilustrativos, se eligieron las imágenes de las dosis que indujeron SDF en el total de la población. (a y a') Células control no tratadas. Sólo los espermatozoides con el ADN fragmentado presentan marcaje de 8-oxoG. (b y b') H_2O_2 (5 mM). Todos los espermatozoides con el ADN fragmentado muestran un intenso marcaje de 8-oxoG. (c y c') SNP (50 mM). Sólo un espermatozoide con abundante 8-oxoG. El resto tienen el ADN fragmentado, pero sólo presentan un marcaje muy suave de 8-oxoG. (d y d') DNasa I (2,5 U). Todos los espermatozoides con el ADN fragmentado pero sin marcaje de 8-oxoG.

Estudio de la frecuencia y distribución de la fragmentación del ADN y la 8-oxoG en espermatozoides de muestras de pacientes sometidos a tratamiento de infertilidad

El estrés oxidativo puede causar SDF. Las células inmunitarias en el fluido seminal y las células espermáticas inmaduras con excesiva retención citoplasmática pueden contribuir a la producción de ROS, que pueden causar roturas en el ADN (Ollero *et al.* 2001; Agarwal *et al.* 2003; Moustafa *et al.* 2004). Por ejemplo, las muestras de espermatozoides de pacientes con leucocitospermia pueden contener altos niveles de ROS y de células espermáticas con el ADN fragmentado (Saleh *et al.* 2002a; Henkel *et al.* 2005). El resultado de las incubaciones con DNasa I sugiere la posibilidad de que el ADN se fragmente en ausencia de daño oxidativo en las bases del ADN, sin embargo, cuando se estudió la SDF y la 8-oxoG en la muestra control (sin tratamiento), se observó que los espermatozoides que presentaba el ADN fragmentado también se marcaban intensamente con la sonda de 8-oxoG. Para tratar de determinar si esto ocurría por norma general, se evaluaron 31 muestras de semen con el test SCD, para ver la fragmentación del ADN, y se incubaron con la sonda de 8-oxoG (Tabla 4).

n = 31	% Espermatozoides	% Espermatozoides con 8-oxoG	Tasa Espermatozoides con 8-oxoG (%)
Halo Grande	67,73 (± 13,59)	0,34 (± 0,61)	0,61 (± 1,07)
Halo Mediano	2,45 (± 1,75)	0,55 (± 0,68)	22,99 (± 20,88)
Halo Pequeño	7,63 (± 3,59)	6,16 (± 3,64)	82,23 (± 24,12)
Sin Halo	13,69 (± 7,23)	13,31 (± 7,11)	97,58 (± 6,33)
Degradadas	8,50 (± 6,39)	6,23 (± 5,87)	71,44 (± 20,60)
Fragmentadas	29,82 (± 12,74)	25,71 (± 11,55)	86,58 (± 10,72)
No Fragmentadas	70,18 (± 12,74)	0,89 (± 1,16)	1,45 (± 2,07)

Tabla 4. Fragmentación del ADN (media ± desviación estándar), analizada utilizando los criterios de tamaños de halo obtenidos con el test SCD, y marcaje de 8-oxoG en muestras espermáticas humanas. Los espermatozoides con el ADN fragmentado muestran halos pequeños o aparecen sin halo o sin halo y degradados. Con el ensayo simultáneo del test SCD / marcaje de 8-oxoG, se puede establecer la tasa de espermatozoides con 8-oxoG en cada categoría (% de espermatozoides con 8-oxoG dentro de cada categoría).

La frecuencia de células con el ADN fragmentado en estas muestras fue 29,8% ($\pm 12,7$), con un rango de variación de 10,5% a 58,4%. La frecuencia de espermatozoides con marcaje de 8-oxoG fue 26,6% ($\pm 12,1$), con un rango de variación de 10,2% a 59,3% y no fue significativamente diferente de la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado. De hecho, la señal de 8-oxoG estaba, prácticamente, restringida a la población de espermatozoides que tenían el ADN fragmentado. Prácticamente todos los nucleoides sin halo estaban marcados. Un 23% de los espermatozoides de halo mediano exhibían marcaje de 8-oxoG, a pesar de no tener el ADN fragmentado. Sin embargo, este dato no tuvo relevancia, ya que las células espermáticas de halo mediano son muy escasas.

De la misma manera que ocurría en el experimento anterior con la muestra control (sin tratamiento), independientemente de la calidad del semen y de la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado, las 31 muestras evaluadas presentaron marcaje de 8-oxoG en la mayoría de los núcleos espermáticos con el ADN fragmentado. Las células sin fragmentación del ADN marcadas con 8-oxoG fueron muy raras.

Estudio de la frecuencia y la distribución de 8-oxoG en muestras seminales con fragmentación del ADN espermático > 30%, para evaluar si el “efecto iceberg” depende del daño oxidativo en aquellos espermatozoides que no tienen el ADN fragmentado

Hay estudios que sugieren que cuando una muestra de semen presenta una frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado relativamente alta ($\geq 30\%$), la probabilidad de conseguir un embarazo viable es muy baja. Estos estudios proponen que la población de espermatozoides que no tiene el ADN fragmentado podría contener algún tipo de daño que no sería compatible con un embarazo viable. Es lo que se denomina “efecto iceberg”, donde la SDF sería la punta del “iceberg”. Estos autores proponen que el daño oxidativo en las bases del ADN, en aquellos espermatozoides que no tienen el ADN fragmentado, podría ser el responsable de este “efecto iceberg” (Evenson *et al.* 1999; Evenson *et al.* 2002; Virro *et al.* 2004; Álvarez 2005).

Para probar esta hipótesis, se estudió la frecuencia y distribución de 8-oxoG en 20 muestras de espermatozoides con una SDF > 30%. El rango de SDF de estas muestras fue 30,9% a 59,0%. Nueve de las muestras dieron lugar a

embarazo tras ICSI, mientras que las once restantes no. Las muestras que dieron lugar a embarazo presentaban una SDF de 36,5% ($\pm 5,0$), con un rango de variación de 31,3% a 47,7%. Las muestras que no dieron lugar a embarazo tenían una SDF de 44,9% ($\pm 11,6$), con un rango de variación de 30,9% a 59,0%. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,115$). El primer grupo presentaba un 31,8% ($\pm 8,4$) de células marcadas con 8-oxoG (rango: 13,4% - 42,8%), mientras que, en el segundo grupo, el porcentaje de células marcadas fue de 40,6% ($\pm 11,5$) (rango: 27,4% - 60,3%) ($p = 0,114$). Como se muestra en la Figura 18, los resultados fueron muy parecidos a los obtenidos en los experimentos anteriores; la 8-oxoG se detectó, principalmente, en las células espermáticas que tienen el ADN fragmentado tanto en las muestras que dieron lugar a embarazo como en las que no. El porcentaje de células de halo mediano marcadas con 8-oxoG fue ligeramente, aunque significativamente, más alto en el grupo que obtuvo embarazo que en el grupo que no, aunque la frecuencia de células de esta categoría es tan baja ($3,21 \pm 1,97\%$ en las muestras que dieron lugar a embarazo y $2,78 \pm 1,74\%$ en las muestras que no) que este dato no tiene relevancia en el total de la población.

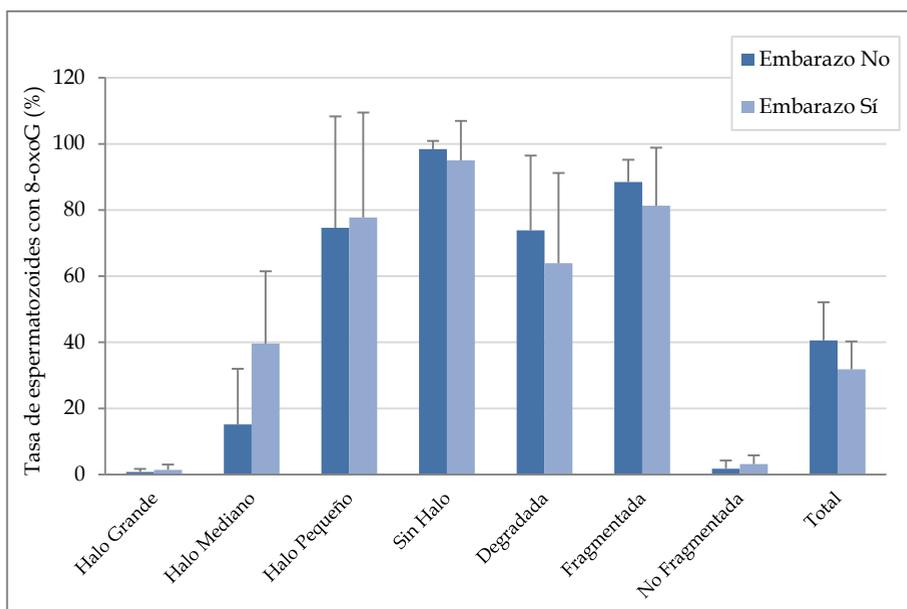


Figura 18. Frecuencias de marcaje de 8-oxoG en las diferentes categorías de tamaños de halo del test SCD (tasa de espermatozoides con 8-oxoG) en muestras que obtuvieron embarazo y muestras que no lo obtuvieron, tras ICSI. Total corresponde a la frecuencia de marcaje de 8-oxoG independientemente de la fragmentación.

Una vez más, prácticamente, sólo las células con el ADN fragmentado fueron positivas para el marcaje con 8-oxoG, incluso en muestras que no dieron lugar a embarazo, descartando así, en principio, un daño oxidativo generalizado al resto de las células que no tienen el ADN fragmentado. Sin embargo, existe la posibilidad de que haya otras lesiones, diferentes a la 8-oxoG, en los espermatozoides que no tienen el ADN fragmentado. Este podría ser el caso del daño inducido en el ADN por NO[•], ya que produce más frecuentemente otro tipo de lesiones en las bases del ADN que 8-oxoG (Szabo & Ohshima 1997; D'Ambrosio *et al.* 2001). Por ejemplo, en pacientes con varicocele, las células endoteliales de las venas dilatadas podrían liberar NO[•], que podría ser una importante fuente de dicho daño oxidativo (Mitropoulos *et al.* 1996; Wiszniewska *et al.* 1997). Sin embargo, el ataque de radicales derivados del NO[•] debería producir no sólo un daño aislado en las bases, sino también roturas en el ADN (Enciso *et al.* 2006).

Estos resultados sugieren una relación directa entre la fragmentación del ADN y el daño oxidativo en las bases del ADN espermático y concuerdan con los de otros autores que concluyen que el daño oxidativo parece ser el mayor contribuyente al daño que se observa en la línea germinal masculina (Moustafa *et al.* 2004; De Iuliis *et al.* 2009; Thomson *et al.* 2011). De hecho, como se demostró en el experimento de incubación con H₂O₂, las ROS pueden producir de manera directa tanto roturas en el ADN como daño en las bases.

Sin embargo, las ROS, además de provocar directamente daño oxidativo en el ADN, también podrían estar implicadas en la regulación de funciones celulares específicas. La mitocondria es tanto una fuente como una diana de ROS y la liberación del citocromo c de la mitocondria, que desencadena la activación de las caspasas, parece estar mediada, en gran parte, por la acción directa o indirecta de ROS (Simon *et al.* 2000). En una serie de experimentos recientes, Koppers *et al.* (2011) muestran que las ROS también podrían inducir fragmentación de manera indirecta en espermatozoides maduros, a través de una apoptosis atípica. Estos autores proponen que la apoptosis en espermatozoides maduros no estaría mediada por un receptor, sino por algún estímulo que, en último término, produciría estrés oxidativo, como la exposición a radiación electromagnética de radiofrecuencia, el criocalmacenamiento, el calor o por la acción directa de H₂O₂. En estos experimentos, proporcionan evidencias de que los espermatozoides maduros pueden entrar en una cascada apoptótica regulada por PI3K (fosfoinositol 3-quinasa) y AKT (una proteína quinasa serina/treonina). La

defosforilación de PI3K alteraría la habilidad de esta quinasa para fosforilar a la siguiente diana en la cascada, AKT. El cambio resultante en la actividad quinasa de AKT resultaría en una modificación de BAD (*BCL-2-associated death promotor*) de un estado fosforilado (anti-apoptótico) a un estado defosforilado (pro-apoptótico). Este cambio en el estado de fosforilación de BAD permitiría a BAK (*BCL-2-antagonist killer*)/BAX (*BCL-2-associated X protein*) la formación de poros pro-apoptóticos en la membrana mitocondrial externa y potenciaría la habilidad de esta molécula de formar poros por sí misma. La defosforilación de BAD y la permeabilización de la membrana mitocondrial estarían asociados a otros cambios celulares típicos de la apoptosis de células somáticas, incluyendo formación de ROS por parte de la mitocondria, activación de caspasas, externalización de fosfatidil serina en la membrana y formación de vacuolas en el citoplasma, además de a una rápida pérdida de la movilidad y la aparición de daño oxidativo en el ADN. En la mayoría de los tipos celulares, la activación de una cascada apoptótica culmina con la fragmentación masiva del ADN y la muerte celular, sin embargo, en este punto, la anatomía altamente especializada del espermatozoide juega un papel limitante. Mientras que en otros tipos celulares la apoptosis se asocia con la traslocación de endonucleasas (AIFM, CAD, ENDOG) al núcleo, Koppers *et al.* (2011) demuestran que esto no ocurre en espermatozoides, probablemente debido a la naturaleza compacta de la cromatina espermática y a la arquitectura altamente compartimentada del espermatozoide maduro, que separa el núcleo, en la cabeza espermática, del citoplasma y la mitocondria, en la pieza media. Sin embargo, la generación de ROS, por parte de la mitocondria, resulta en la inducción de daño oxidativo en el ADN, como se refleja en sus experimentos por la aparición de 8-oxoG. La elevada correlación existente entre la formación espontánea de 8-oxoG y la fragmentación del ADN, como se demuestra también en nuestro experimento de incubación con H₂O₂, les lleva a concluir que, en último término, la apoptosis en espermatozoides maduros resultaría en fragmentación del ADN, aunque sería un proceso conducido por el efecto de un estrés oxidativo, más que por la actividad de endonucleasas. Así, la fragmentación del ADN podría ser una expresión directa del daño inducido por las ROS liberadas por la mitocondria, como consecuencia de un proceso apoptótico desencadenado por un estrés oxidativo.

Por otro lado, tampoco podemos descartar que la fragmentación del ADN que se observa en la línea germinal pueda surgir como consecuencia de la retención de las roturas en el ADN producidas durante la espermiogénesis, como resultado de una alteración en la diferenciación de las células

germinales, a causa de un estrés oxidativo (Aitken & Curry 2011). De hecho, hay muchas evidencias que relacionan la SDF con un defecto en la remodelación de la cromatina durante la espermatogénesis (Bianchi *et al.* 1993; Nasr-Esfahani *et al.* 2005; De Iuliis *et al.* 2009; Tavalaei *et al.* 2009).

El procedimiento técnico utilizado para estudiar daño oxidativo en las bases en combinación con la SDF podría ser una herramienta muy útil para estudiar el origen de las alteraciones de la integridad del ADN.

Objetivo 2.

Estudio de la matriz nuclear en células espermáticas con el ADN fragmentado.

Existen numerosas técnicas para analizar la SDF, y cada vez surgen más publicaciones que se centran en el estudio del daño en el ADN espermático y de su utilidad para predecir fertilidad. Sin embargo, nunca se ha considerado que la condición de la matriz nuclear en células espermáticas también podría aportar información útil para predecir el éxito en la reproducción. Hay evidencias que indican que la matriz nuclear espermática desempeña un papel en la función que realiza el genoma paterno durante el desarrollo temprano (Ward *et al.* 1999) y se ha demostrado que la organización del ADN en dominios en forma de bucle, por medio de la matriz nuclear, es necesaria para que se produzca la formación del pronúcleo masculino y el inicio de la síntesis del ADN (Shaman *et al.* 2007a; Yamauchi *et al.* 2007a; Yamauchi *et al.* 2007b). Por otro lado, el estudio de la matriz proteica en células espermáticas con el ADN fragmentado podría aportar datos que nos permitan avanzar en el estudio del origen de la SDF. Los resultados obtenidos en el primer objetivo de este trabajo indican una clara relación entre la SDF y la presencia de daño oxidativo en las bases del ADN, en forma de 8-oxoG. El estrés oxidativo podría provocar directamente la fragmentación del ADN o podría inducir una cascada apoptótica que, en último término, daría lugar a la fragmentación del ADN por la acción de ROS liberadas por la mitocondria. La inducción de un proceso apoptótico en células somáticas se asocia con diferentes cambios a nivel morfológico, como condensación de la cromatina, contracción del núcleo y formación de cuerpos apoptóticos. Estos cambios morfológicos se producen como consecuencia de alteraciones a nivel molecular, como proteólisis de polipéptidos, modificaciones post-traduccionales de proteínas nucleares y fragmentación del ADN y ARN (Martelli *et al.* 2001). Esto nunca se ha estudiado en espermatozoides. No se sabe si hay diferencias o no en la matriz proteica nuclear entre espermatozoides con el ADN fragmentado y los que no lo tienen. Así, la cuestión es si el fenómeno que lleva a la fragmentación del ADN en espermatozoides también se asocia a modificaciones en la matriz proteica.

Para tratar de estudiar de manera simultánea la fragmentación del ADN y la condición de la matriz nuclear proteica, se probaron diferentes protocolos en muestras espermáticas de veinte hombres, cuatro fértiles y el resto infértiles, con un rango de fragmentación del ADN de 5,13% a 48,00%.

Cuando las células espermáticas humanas son lisadas en un microgel para eliminar membranas y proteínas, tras la tinción de ADN, se observa que los núcleos que no tienen el ADN fragmentado presentan halos de dispersión

de bucles de ADN que se extienden en torno a un core central. Esto último es una consecuencia de la exitosa extracción de protaminas (Tsanev & Avramova 1981; Rodman *et al.* 1982). Por el contrario, los núcleos que tienen el ADN fragmentado presentan grandes halos de difusión de puntos de cromatina (Figuras 19 y 20). Esto es un ensayo de difusión típico para la determinación de la fragmentación del ADN (Singh 2000).

Tras lisar las células con una lisis fuerte (lisis con SDS), la tinción con el fluorocromo mercuridibromofluoresceína demostró que las proteínas de la matriz nuclear no permanecían el core de aquellas células espermáticas que no tenían el ADN fragmentado. Sorprendentemente, los espermatozoides con el ADN fragmentado tendían a retener proteínas residuales de la matriz nuclear en un estado colapsado y agregado (Figura 19).

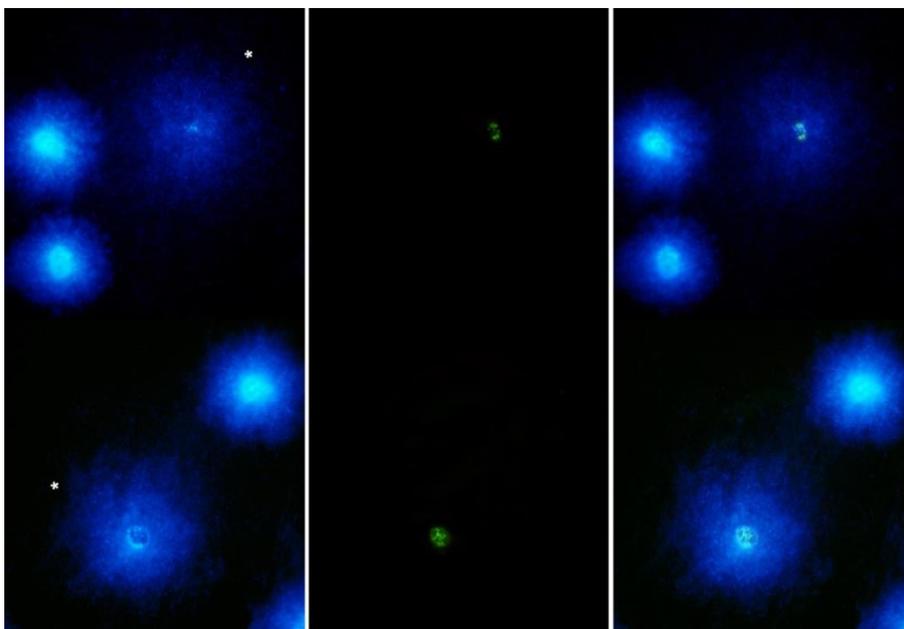


Figura 19. Células espermáticas humanas tratadas con la solución de lisis fuerte (con SDS). Izquierda: Tinción de ADN con DAPI. Centro: Tinción de proteína con mercuridibromofluoresceína. Derecha: Fusión de las dos imágenes. *: Células con el ADN fragmentado. La tinción con DAPI muestra que los espermatozoides que no tienen el ADN fragmentado presentan halos de dispersión de bucles de ADN, mientras que las células que tienen el ADN fragmentado presentan grandes halos de difusión de fragmentos de ADN. La tinción de proteína muestra que sólo las células con el ADN fragmentado retienen una matriz proteica residual en un estado condensado y colapsado.

Se observaron diferentes grados de retención de proteína en espermatozoides con el ADN fragmentado, algunas células presentaban puntos residuales de proteína y otras mostraban una tinción de proteína muy tenue. Todas las muestras analizadas mostraron solubilidad diferencial de la proteína nucleoesquelética en células espermáticas con el ADN fragmentado. Las células espermáticas con el ADN fragmentado que no retuvieron proteína nuclear residual fueron muy escasas. La proporción de estas células fue diferente en las diferentes muestras y nunca excedió el 7,9% de células fragmentadas.

Cuando se utilizó una solución de lisis menos agresiva, en la que se había sustituido el SDS por Tritón X-100 y NaCl, las células espermáticas con el ADN fragmentado retenían las proteínas nucleares residuales incluso más densamente agregadas, observándose una intensidad de tinción 2 veces más fuerte que cuando se utilizó la lisis más fuerte. Pero en este caso, la matriz nuclear residual de proteína también permanecía en las células espermáticas sin fragmentación del ADN, aunque homogéneamente distribuidas en el core y mostrando una intensidad de tinción media 4,9 veces menor que en las células con el ADN fragmentado (Figura 20, Tabla 5).

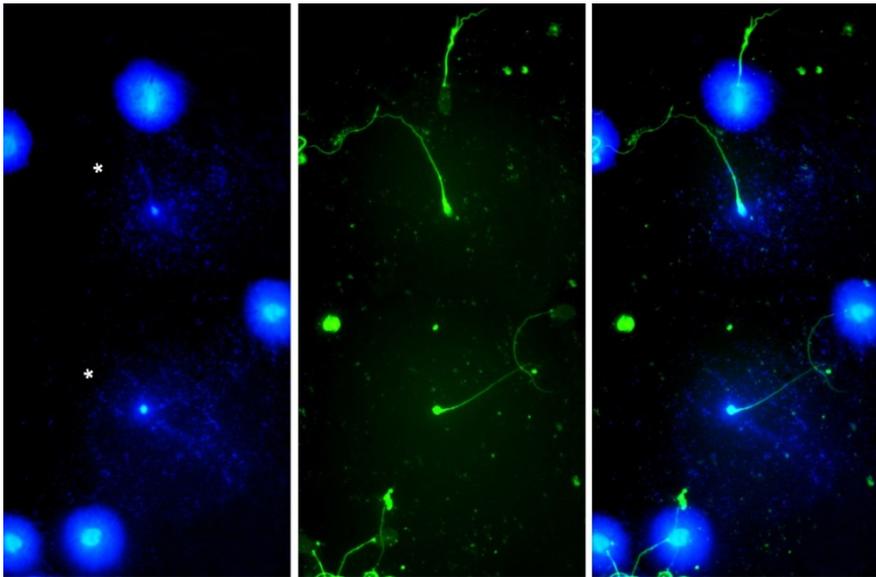


Figura 20. Células espermáticas humanas tratadas con una solución de lisis suave (sin SDS). Izquierda: Tinción de ADN con DAPI. Centro: Tinción de proteína con mercuridibromofluoresceína. Las colas de los espermatozoides se mantienen. Derecha: Fusión de las dos imágenes. *: Células con el ADN fragmentado. Las células con el ADN intacto presentan matrices proteicas homogéneas y tenuemente teñidas, mientras que las que tienen el ADN fragmentado presentan matrices densas y agregadas.

Cuando se utilizó el test SCD, el tratamiento ácido antes de la lisis impidió la respuesta diferencial a la eliminación de las proteínas (Figura 21, Tabla 5).

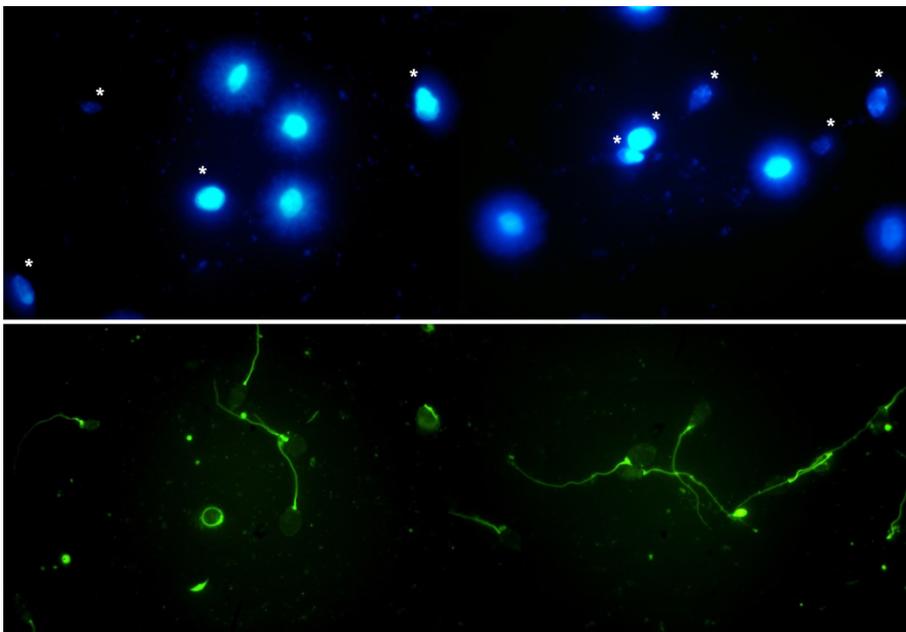


Figura 21. Células espermáticas humanas procesadas con el test SCD. Arriba: Tinción de ADN con DAPI. Abajo: Tinción de proteína con mercuridibromofluoresceína. *: Células con el ADN fragmentado. No se observaron diferencias en cuanto a la matriz proteica nuclear entre células fragmentadas y no fragmentadas.

Tampoco se observaron diferencias en la tinción de proteína en células espermáticas intactas no lisadas (Figura 22).

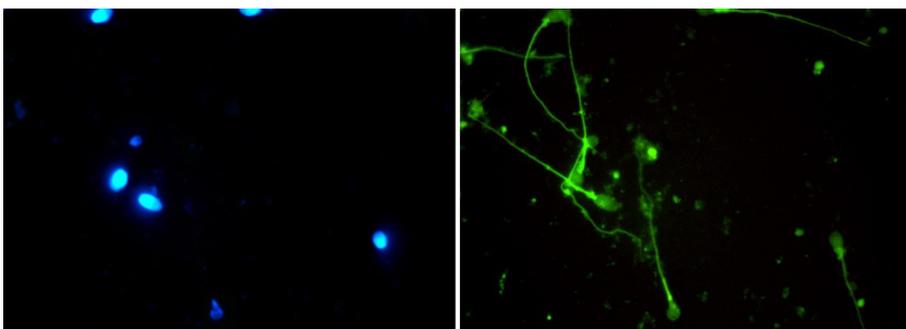


Figura 22. Células espermáticas humanas intactas incluidas en un microgel. Izquierda: Tinción de ADN con DAPI. Derecha: Tinción de proteína con mercuridibromofluoresceína. No se observaron diferencias entre células.

Estado del ADN		Área DAPI	Área proteína	Intensidad Media Proteína
Lisis Fuerte	Fragmentada	50100,6 ± 7620,1 ^a	223,3 ± 121,2	1261,3 ± 820,0
	No Fragmentada	29126,7 ± 3612,2 ^a	-	-
Lisis Suave	Fragmentada	47073,2 ± 7550,9 ^b	612,6 ± 236,2 ^d	2487,5 ± 1055,1 ^e
	No Fragmentada	26956,0 ± 3920,1 ^b	2538,4 ± 1075,7 ^d	506,0 ± 174,2 ^e
SCD	Fragmentadas	3723,1 ± 2672,5 ^c	2182,1 ± 986,4	838,0 ± 113,8
	No Fragmentadas	19582,6 ± 12912,1 ^c	2691,4 ± 1013,1	706,1 ± 102,3
Sin Lisis		740,4 ± 112,7	997,1 ± 161,4	4353,5 ± 1036,4

Tabla 5. Resultados del análisis digital de imagen (media ± desviación estándar) de 80 células espermáticas de cada tipo. El área se mide en píxeles y la intensidad media en unidades arbitrarias. ^{a, b, c, d, e}; $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la SDF se asocia con algún tipo de modificación en las proteínas de la matriz nuclear y que el paso de lisis desenmascara esta condición nuclear proteica diferencial presente en espermatozoides con el ADN fragmentado. Estas modificaciones podrían deberse a alteraciones químicas o enzimáticas cualitativas en algunas o en todas las proteínas de la matriz nuclear. También podrían ser el resultado de variaciones cuantitativas o desequilibrios estequiométricos. Se ha publicado que la deficiencia de protaminas o proteínas de transición en ratones y humanos puede dar lugar a fragmentación del ADN (Cho *et al.* 2001; Cho *et al.* 2003; Meistrich *et al.* 2003). Sin embargo, tales desequilibrios nunca se han descrito para otras proteínas nucleares estructurales. Estas observaciones también podrían ser el resultado de un ensamblaje estructural anormal de las proteínas nucleoesqueléticas. De hecho, se han descrito diferentes grados de desorganización e inestabilidad de la matriz nuclear en pacientes con criptorquidia (Barone *et al.* 2000), sugiriendo que ésta podría ser la causa de la infertilidad en estos pacientes. También podría ocurrir que las proteínas nucleares se unan más ávidamente al ADN dañado pero, en este caso, la tinción de DAPI en el core tendría que ser más alta en nucleoides con el ADN fragmentado que en aquellos con el ADN no fragmentado. Sin embargo, el resultado fue opuesto, descartando esta posibilidad.

Tras obtener estos resultados, la cuestión era si el fenómeno que daba lugar a la fragmentación del ADN en espermatozoides también daba lugar a

modificaciones en la matriz proteica nuclear o si estas modificaciones en la matriz ocurrían antes que la fragmentación. Para estudiar esto, se cultivaron cinco muestras de espermatozoides a 37°C durante 48 h para inducir fragmentación en su ADN. El porcentaje de células con el ADN fragmentado aumentó de 10,6, 20,6, 26,5, 29,4 y 44,4, a 54,6, 50,5, 55,1, 61,9 y 79,4, respectivamente. Sólo esas células con el ADN fragmentado tendían a retener la matriz nuclear residual. En todos los casos, las nuevas células añadidas al resto de células con el ADN fragmentado adquirirían estas características. Este experimento de incubación prolongada sugiere que la modificación de la matriz nuclear no es anterior a la fragmentación del ADN, sino que la acompaña, y parece razonable pensar que la modificación de la matriz nuclear espermática podría ser una consecuencia del mismo mecanismo que genera la fragmentación del ADN.

Estos resultados y los obtenidos en el primer objetivo de esta tesis parecen señalar al estrés oxidativo como responsable de ambos sucesos. El estrés oxidativo, especialmente si va acompañado por citoquinas inflamatorias y proteasas, puede inducir modificaciones químicas en el ADN y las proteínas nucleares. Así, la fragmentación del ADN y la modificación en la matriz nuclear podrían ser una consecuencia directa del estrés oxidativo. Por otro lado, el estrés oxidativo podría inducir una cascada apoptótica que, en último término, daría lugar a la fragmentación del ADN por la acción de ROS liberadas por la mitocondria (Koppers *et al.* 2011). Las modificaciones que observamos en la matriz proteica nuclear de los espermatozoides con el ADN fragmentado podrían ser similares al colapso y a la condensación de la cromatina que acompaña la degradación apoptótica del ADN que ocurre en células somáticas. De hecho, los resultados obtenidos tras lisar una muestra de leucocitos con la solución de lisis suave, sin SDS, son bastante similares a los obtenidos en espermatozoides con la solución de lisis más fuerte, con SDS (Figura 23). Sólo los leucocitos apoptóticos tendían a retener una matriz nuclear residual en un estado condensado y colapsado. Esto sólo se observó cuando se utilizó la solución de lisis suave y desapareció cuando empleamos la solución más fuerte, evidenciando una mayor resistencia del núcleo espermático, probablemente debido a su mayor compactación.

En células somáticas, la condensación cromatínica apoptótica ocurre como consecuencia de una proteólisis dependiente de caspasas (Martelli *et al.* 2001) que podría estar regulada a través de nucleoplasmina y acinus, dos proteínas activadas por caspasa 3 (Sahara *et al.* 1999; Lu *et al.* 2005). Estas características no han sido estudiadas en células espermáticas, aunque

diferentes caspasas, incluyendo caspasa 3, pueden ser activadas en espermatozoides humanos (Paasch *et al.* 2004). Además, Koppers *et al.* (2011) demostraron que la activación de una cascada apoptótica intrínseca en espermatozoides maduros daba lugar, además de a la activación de caspasas y externalización de fosfatidil serina en la membrana, a cambios ultraestructurales similares a los observados en células somáticas, específicamente resultaba en la aparición de grandes vacuolas y protuberancias en la membrana en la pieza media del espermatozoide.

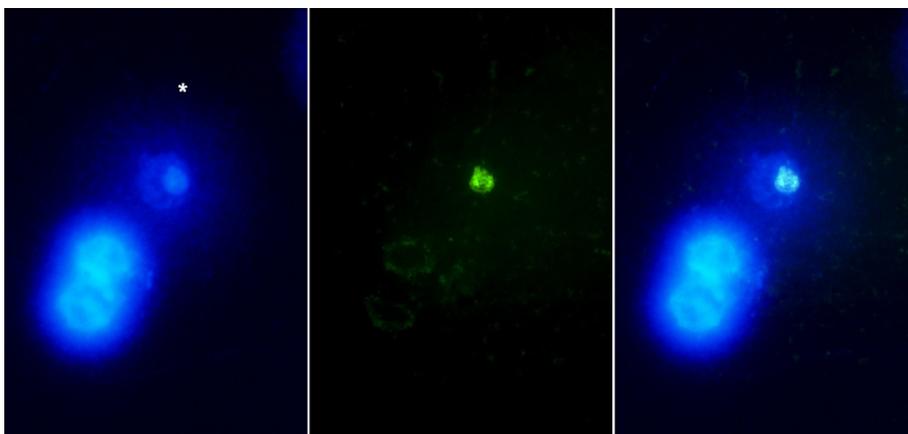


Figura 23. Leucocitos humanos de sangre periférica tratados con la solución de lisis suave, sin SDS. Izquierda: Tinción de ADN con DAPI. Centro: Tinción de proteína con mercuridibromofluoresceína. Derecha: Fusión de las dos imágenes. *: Leucocito apoptótico. A diferencia de las células que no tienen el ADN fragmentado, los leucocitos apoptóticos retienen una matriz nuclear residual en un estado condensado y colapsado.

Aun así, no podemos descartar que la fragmentación del ADN y la modificación en la matriz proteica nuclear observados en las células espermáticas sea una consecuencia de las roturas provocadas por la topoisomerasa II durante la remodelación de la cromatina en la espermiogénesis, aunque este mecanismo parece improbable, debido a que la topoisomerasa II es una enzima específica de ADN y nunca se ha descrito ninguna modificación en la matriz proteica nuclear asociada a su actividad.

De cualquier modo, nuestros resultados indican que el proceso que inicia la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos también se expresa a nivel de la matriz nuclear.

Objetivo 3.

Evaluación de la longitud media de la secuencia de ADN telomérico y su relación con la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos.

Los telómeros son repeticiones en tándem $(5'-TTAGGG-3')_n$ muy conservadas a lo largo de la evolución que confieren estabilidad al cromosoma, previenen la degradación de sus extremos y mantienen la integridad genómica (Thilagavathi *et al.* 2012b). Son secuencias ricas en guanina, lo cual hace que sean más sensibles al estrés oxidativo (Kawanishi & Oikawa 2004). De hecho, se ha demostrado que la exposición de ADN a estrés oxidativo induce mayor cantidad de 8-oxoG en secuencias teloméricas que en secuencias no teloméricas (Oikawa & Kawanishi 1999; Oikawa *et al.* 2001). En espermatozoides, los telómeros están anclados a la membrana nuclear, en la periferia del núcleo espermático, unidos a histonas. La posición que ocupan en el núcleo y el hecho de que están unidos a histonas y, por tanto, en un estado menos condensado hace que sean más accesibles y vulnerables al ataque oxidativo, que puede producir roturas en la secuencia telomérica dando lugar al acortamiento de los telómeros (Thilagavathi *et al.* 2012a).

Los resultados obtenidos en los trabajos que se exponen en esta tesis parecen señalar al estrés oxidativo como el principal responsable del daño en el ADN observado en la línea germinal. Si esto es así, parece lógico pensar que aquellos espermatozoides que presentan fragmentación en el ADN espermático también podrían tener los telómeros más cortos.

La longitud del telómero es variable entre individuos e incluso dentro de las células del mismo individuo (Baird *et al.* 2006). Esto podría afectar a los resultados cuando se trata de comparar el tamaño del telómero entre diferentes individuos y relacionarlo con la SDF. En humanos, las muestras de semen son heterogéneas en composición. Cuando se utilizan espermatozoides con fines terapéuticos es necesario aplicar técnicas que eliminen los espermatozoides muertos e inmóviles y las células no espermáticas. La técnica de *swim-up* se utiliza de manera rutinaria en los laboratorios de reproducción asistida para seleccionar la población de espermatozoides con mayor movilidad. Estas muestras contienen espermatozoides con parámetros bioquímicos, morfológicos y cinéticos mejores que el resto de la población, además de presentar un porcentaje menor de células con el ADN fragmentado (Spano *et al.* 1999; Younglai *et al.* 2001). De hecho, se ha publicado una correlación negativa entre la movilidad y la SDF (Huang *et al.* 2005). Nuestros resultados también indican que la población de espermatozoides con mayor movilidad presenta un menor nivel de fragmentación del ADN en comparación con el semen fresco (Figura 24). Sólo una muestra no se distribuye de este modo. La

fragmentación del ADN disminuyó de 26,20% ($\pm 13,40$) en el semen fresco a 6,25% ($\pm 15,12$) en los espermatozoides seleccionados por *swim-up* ($p < 0,001$). Esto nos proporciona una herramienta muy útil para correlacionar la SDF con la longitud telomérica. El hecho de poder separar la subpoblación de espermatozoides de mejor calidad y con menos SDF y poder compararla con la población total de espermatozoides del mismo individuo, nos permite establecer una correlación clara entre el tamaño del telómero y la SDF, eliminando esas variaciones interindividuales que podrían afectar a los resultados.

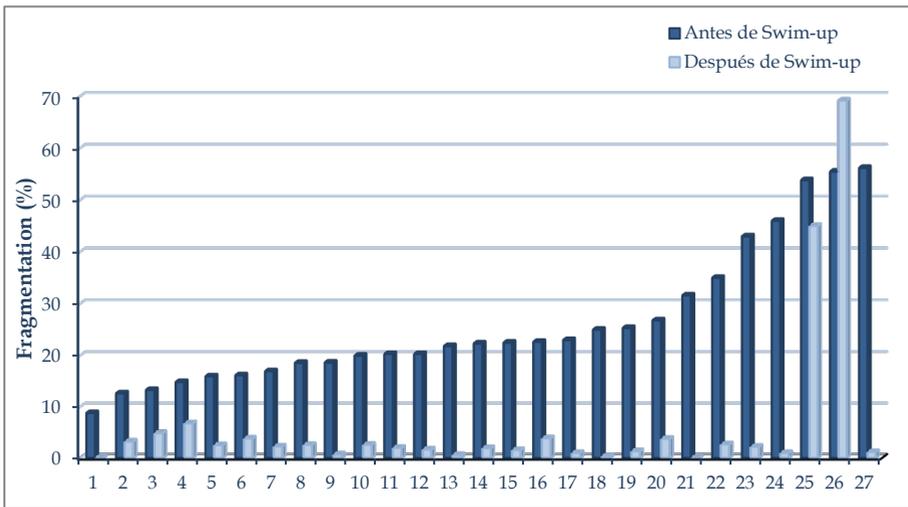


Figura 24. Porcentaje de células espermáticas con el ADN fragmentado en el semen fresco (antes de *swim-up*) y en la población de células seleccionadas por *swim-up* (después de *swim-up*) en 27 muestras espermáticas. Las muestras se ordenaron por frecuencia creciente de espermatozoides con el ADN fragmentado antes de *swim-up*.

La longitud relativa del telómero en la población de espermatozoides con alta movilidad fue mayor que en las muestras frescas, excepto en tres casos (Figura 25). El Ratio T/S aumentó de $948,93 \pm 144,82$, en el semen fresco, a $1142,85 \pm 199,54$, en los espermatozoides seleccionados por *swim-up* ($p < 0,001$).

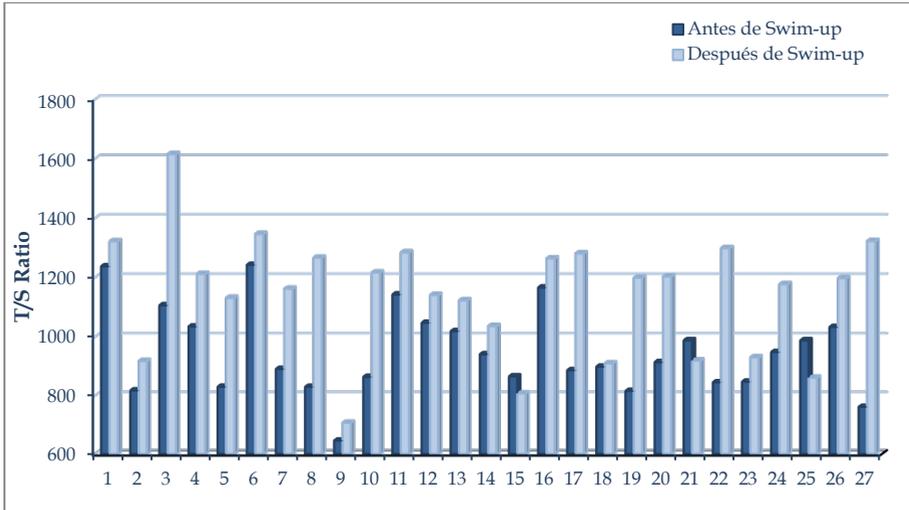


Figura 25. Longitud media de la secuencia telomérica de los espermatozoides en el semen fresco (antes de swim-up) y en la población de células seleccionadas por swim-up (después de swim-up) en 27 muestras espermáticas. Las muestras se ordenaron por frecuencia creciente de espermatozoides con el ADN fragmentado antes de swim-up.

Aunque la disminución en el nivel de fragmentación del ADN de los espermatozoides va acompañada con un aumento en el ratio T/S tras *swim-up*, sus niveles no fueron proporcionales (r de Pearson = $-0,223$; $p = 0,264$), es decir, aquellas muestras en las que se observó un mayor descenso de la fragmentación, tras el *swim-up*, no fueron las que presentaron un mayor incremento en la longitud media relativa del telómero, cuando se compararon los ratios T/S antes y después de *swim-up*. Tampoco se observó una correlación significativa entre la longitud media relativa del telómero y la SDF tanto en el caso del semen fresco (r de Pearson = $-0,204$; $p = 0,307$) como en el caso de la población de células seleccionadas por *swim-up* (r de Pearson = $-0,067$; $p = 0,741$). Algo similar les ocurrió a Thilagavathi *et al.* (2012a) cuando analizaron la longitud del telómero espermático en un grupo de hombres infértiles. Observaron que la longitud media relativa del telómero en el grupo de hombres infértiles era significativamente menor que la del grupo control, sin embargo, ni la fragmentación ni los niveles de ROS ni ninguno de los parámetros seminales estándar estudiados correlacionó de manera significativa con el ratio T/S. Es muy posible que esto sea debido a la variabilidad que existe entre individuos, ya que estamos evaluando la longitud absoluta del telómero, y no el acortamiento que haya podido sufrir.

Aun así, los resultados de comparar el ratio T/S entre las muestras en fresco y las seleccionadas por *swim-up* dejan claro que existe una relación entre la SDF y la longitud del telómero. Es posible que el mismo fenómeno que está causando la SDF también esté produciendo un acortamiento en la longitud del telómero. Existen numerosos estudios *in vitro* que demuestran que el estrés oxidativo crónico da lugar al acortamiento del telómero (revisado en Houben *et al.* (2008)). Otra evidencia del efecto del estrés oxidativo en la longitud del telómero se puede obtener de los estudios que asocian el acortamiento telomérico con enfermedades en las que el estrés oxidativo y la inflamación juegan un importante papel (Houben *et al.* 2008). La fragmentación del ADN y el acortamiento de los telómeros podrían ser una consecuencia directa del estrés oxidativo o bien, el estrés oxidativo podría dar lugar al acortamiento telomérico y desencadenar una cascada apoptótica que, en último término, daría lugar a la fragmentación del ADN por la acción de ROS liberadas por la mitocondria (Koppers *et al.* 2011). De hecho, un estudio en células tumorales, llevado a cabo por Ren *et al.* (2001), proporciona evidencias de la existencia de un mecanismo apoptótico, independiente de caspasas y relacionado con el acortamiento del telómero, en el que las ROS juegan un papel principal. Ellos demuestran que el acortamiento telomérico (pero no la inhibición de la telomerasa) es el evento primario durante la apoptosis inducida por $\cdot\text{OH}$. Proponen que, en esta apoptosis inducida por ROS, el telómero podría ser una diana directa de $\cdot\text{OH}$.

Tras cada ronda de replicación, se pierden entre 50 - 150 pb de la secuencia telomérica terminal. La telomerasa es una transcriptasa inversa especializada que sintetiza nuevas secuencias teloméricas. En la mayoría de células somáticas, la telomerasa no está activa o, al menos, no suficientemente activa y, como consecuencia, las células en división experimentan un acortamiento progresivo de sus telómeros. Tras un determinado número de divisiones celulares, los telómeros se acortan de manera crítica perdiendo su función y desencadenando la senescencia celular. La célula deja de proliferar y entra en apoptosis. De esta manera, el tamaño del telómero limita el potencial de replicación y la esperanza de vida de las células somáticas (Bailey & Murnane 2006; Lansdorp 2009). Al revés de lo que ocurre en las células somáticas, las células de la línea germinal presentan una fuerte actividad telomerasa, de modo que los telómeros se mantienen en su máxima longitud. Sin embargo, a pesar de tener el tamaño medio de telómero más largo, la longitud telomérica de los espermatozoides parece variar enormemente entre los distintos individuos y aún más entre los distintos

espermatozoides. De hecho, se ha observado que el 3,6% de los espermatozoides presentan telómeros severamente acortados en el brazo corto de los cromosomas X e Y. Este acortamiento del telómero en la línea germinal masculina podría contribuir a los niveles de aneuploidía observados en los espermatozoides humanos y podría estar relacionado con la baja tasa de fecundidad de los seres humanos (Baird *et al.* 2006).

En espermatozoides humanos, los telómeros se localizan en la periferia nuclear, unidos a la matriz nuclear, donde forman dímeros y tetrámeros, y juegan un papel fundamental en la organización del núcleo espermático (de Lange 1992; Luderus *et al.* 1996; Zalensky *et al.* 1997). Varios complejos proteicos estabilizan la estructura telomérica y regulan la longitud del telómero (Bailey & Murnane 2006). Moskovtsev *et al.* (2010) han demostrado que la SDF se asocia con alteraciones de las interacciones telómero-telómero y sugieren que esto podría dar lugar a la pérdida de la organización en forma de bucles del cromosoma. Tanto la longitud del telómero como su estructura son críticas para desempeñar su función (Treff *et al.* 2011). Estas repeticiones hexaméricas ricas en guanina son el primer lugar del genoma espermático en responder a la señal del ovocito para la formación del pronúcleo y también juegan un papel en sinapsis, recombinación homóloga y segregación (Gineitis *et al.* 2000; Liu *et al.* 2002; Thilagavathi *et al.* 2012b).

La actividad telomerasa no es significativa en ovocitos maduros ni en embriones en proceso de segmentación, pero es alta en blastocistos. A pesar de esto, los telómeros se alargan notablemente durante los primeros ciclos de la división mediante un mecanismo basado en la recombinación (Liu *et al.* 2007). Sin embargo, tras la fecundación, la presencia de telómeros acortados de manera crítica, tanto si vienen del espermatozoide como si vienen del ovocito, podría dar lugar a anomalías en la división y el desarrollo del embrión, como se ha demostrado en estudios con ratones knock-out (Liu *et al.* 2002). Es posible que los espermatozoides con telómeros acortados no sean capaces de responder a las señales del ovocito para la formación del pronúcleo. Esto podría dar lugar a alteraciones en la segmentación, que resultaría en blastocistos de mala calidad, aumento de la apoptosis o fallos en la implantación del embrión (Hemann *et al.* 2001). En humanos, se ha descrito que la longitud del telómero en ovocitos predice la fragmentación citoplasmática, relacionada con la apoptosis, en embriones (Keefe *et al.* 2005). Estos estudios parecen indicar que a pesar del proceso de alargamiento telomérico que tiene lugar en embriones, el tamaño de los telómeros derivado de los espermatozoides podría influir en el desarrollo embrionario.

La selección de espermatozoides que se lleva a cabo cuando se realiza la técnica de *swim-up* podría simular la selección de espermatozoides que ocurre en el tracto genital femenino antes de la fecundación. Se puede especular, por lo tanto, que es más probable que el ovocito sea fecundado por un espermatozoide con alta movilidad, con el ADN íntegro y con un tamaño de telómero adecuado, que por un espermatozoide de mala calidad.

La longitud del telómero está siendo considerada como un posible biomarcador de la edad biológica, que podría utilizarse para predecir la longevidad (Njajou *et al.* 2007). De hecho, podría ser un factor determinante en la limitación de la vida, al menos a nivel celular (Lansdorp 2009). La longitud del telómero está parcialmente determinada genéticamente y está notablemente sesgada por la edad paterna, pero también se ve influenciada por factores internos y externos (Bailey & Murnane 2006; Njajou *et al.* 2007; Lansdorp 2009). Sin embargo, sería de gran interés comprobar si la selección de espermatozoides con telómeros más largos podría contribuir a aumentar la longevidad de la descendencia.

Objetivo 4.

Estudio del efecto del cáncer sobre la fragmentación del ADN espermático.

Existen opiniones contradictorias acerca de si el cáncer, por sí mismo, puede afectar a la SDF (Stahl *et al.* 2009; Smit *et al.* 2010) y, puesto que no es fácil conseguir muestras de este tipo de pacientes, no hay demasiados estudios que aborden este tema y, en la mayoría, el número de pacientes analizados no es muy alto.

En este estudio, se determinó la SDF en 75 pacientes con cáncer, antes de recibir cualquier tipo de tratamiento, y se comparó con la SDF de un grupo de donantes fértiles (n=50) y de un grupo de pacientes infértiles (n=166), para determinar si la enfermedad, por sí misma, afectaba a la calidad del ADN espermático.

Dentro del grupo de pacientes con cáncer, se definieron seis subgrupos, atendiendo al tipo de cáncer que presentaban: linfoma Hodgkin (n = 16), linfoma no Hodgkin (n = 6), leucemia (n = 6), tumor testicular (de tipo no seminoma) (n = 11), seminoma (n = 26) y otros (n = 10). La SDF media en estos pacientes fue: 35,8% (\pm 22,52). No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de daño del ADN espermático entre las seis categorías definidas. El porcentaje de SDF se distribuyó de la siguiente manera: linfoma Hodgkin 28,08% (\pm 20,04), linfoma no Hodgkin 31,50% (\pm 13,82), leucemia 46,18% (\pm 35,72), tumores de origen testicular de tipo no seminoma 31,18% (\pm 18,16), tumores de origen testicular de tipo seminoma 34,39% (\pm 20,80) y otros 48,84% (\pm 25,03) (Figura 26).

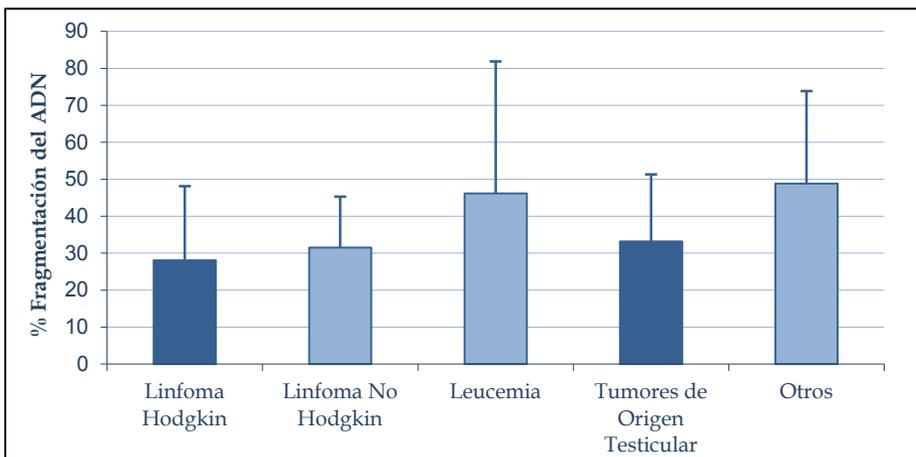


Figura 26. Porcentaje de células con el ADN fragmentado en los diferentes grupos de pacientes con cáncer. No se observaron diferencias significativas en los grupos estudiados.

A continuación, se comparó el nivel de SDF entre los cuatro grupos previamente definidos (donantes fértiles, pacientes sometidos a tratamiento de fertilidad que consiguieron embarazo en el primer intento, pacientes sometidos a tratamiento de infertilidad que no consiguieron embarazo en el primer intento, y pacientes con cáncer) (Figura 27). Se observó un incremento progresivo de la fragmentación del ADN del grupo de donantes fértiles al grupo de pacientes con cáncer, siendo este último grupo el que presentaba el nivel más alto de fragmentación del ADN. Los dos grupos de pacientes infértiles y el grupo de pacientes con cáncer presentaban un nivel de fragmentación del ADN significativamente más alto que el grupo de donantes fértiles, mientras que no se encontraron diferencias significativas en el nivel de fragmentación entre pacientes infértiles y pacientes con cáncer.

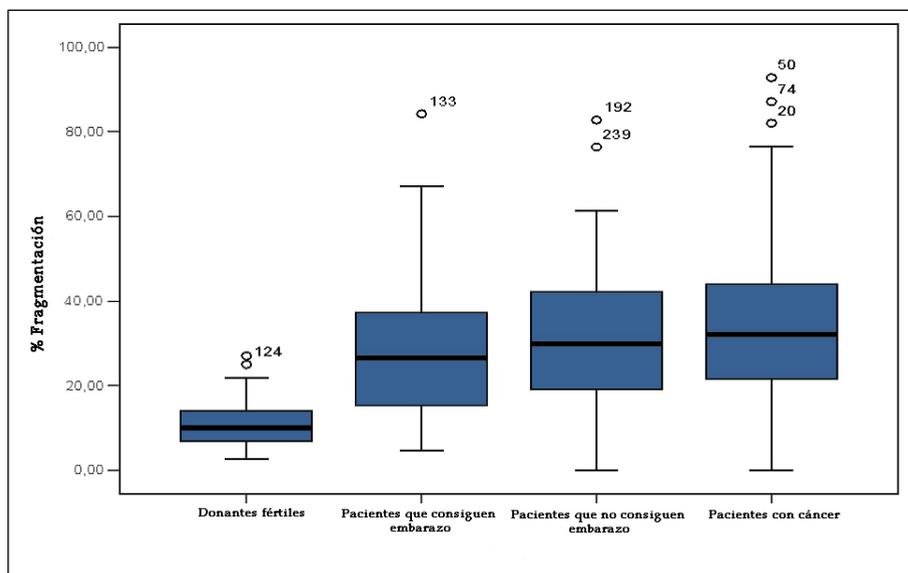


Figura 27. Porcentaje de SDF en donantes fértiles, pacientes infértiles que consiguen embarazo tras el primer intento en un ciclo de FIV, pacientes infértiles que no consiguen embarazo tras el primer intento en un ciclo de FIV y pacientes con cáncer. La línea horizontal en la caja representa la mediana; la línea inferior de la caja indica el primer cuartil; la línea superior de la caja, el tercer cuartil; y los “bigotes” (los extremos de las líneas verticales) son el valor máximo y mínimo de los datos. Los puntos fuera de la caja representan valores anormales.

No existen muchas publicaciones en las que se estudie la integridad del ADN espermático en pacientes con cáncer y en alguno de estos estudios el número de pacientes analizados es demasiado bajo. Esta podría ser una de las causas de las discrepancias existentes en los resultados obtenidos

(Thomson *et al.* 2002; O'Donovan 2005; Spermon *et al.* 2006; Edelstein *et al.* 2008; O'Flaherty *et al.* 2008; Ribeiro *et al.* 2008; Said *et al.* 2009; Stahl *et al.* 2009; Smit *et al.* 2010). Nosotros hemos analizado la integridad del ADN, utilizando el test SCD, en 75 pacientes con cáncer, observando un incremento del daño en el ADN espermático de estos pacientes, comparable con el observado en pacientes infértiles y significativamente más alto que en donantes de esperma sanos. La metodología utilizada para determinar la SDF también podría tener algo que ver en la polémica que rodea a este tema. El test SCD requiere un bajo número de células para determinar la SDF, con lo cual es una herramienta muy útil para analizar el daño en el ADN en pacientes con oligozoospermia severa, una condición que se da de manera frecuente en pacientes con cáncer (Ragni *et al.* 2005).

Con respecto al hecho de no encontrar diferencias significativas en cuanto al nivel de SDF entre los diferentes tipos de cáncer estudiados, en particular, llama la atención que, en comparación con los otros tipos de cáncer, el cáncer de origen testicular y el linfoma de Hodgkin no se asociaron a los mayores niveles de fragmentación del ADN. Tanto los pacientes con cáncer testicular como los pacientes con linfoma de Hodgkin tienen la espermatogénesis alterada en el momento del diagnóstico (Petersen *et al.* 1999; Rueffer *et al.* 2001; Blackhall *et al.* 2002).

Está bien establecido que el cáncer testicular se asocia con un mal funcionamiento testicular. Se postula que la enfermedad forma parte del síndrome de disgenesia testicular, incluyendo también hipospadias, defectos en la espermatogénesis y criptorquidia (Skakkebaek *et al.* 2001) y se ha observado un aumento en el nivel de SDF asociado a un aumento en ROS, en hombres con criptorquidia (Smith *et al.* 2007). En estos pacientes el daño en el ADN espermático podría estar relacionado con una alteración general en la espermatogénesis.

La disfunción gonadal observada en pacientes con linfoma de Hodgkin se cree que es causada por un efecto sistémico de la enfermedad, posiblemente debido a la actividad de las citocinas. Se ha observado un aumento de las concentraciones de interleucinas en suero, incluyendo interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), en pacientes con linfoma de Hodgkin, con niveles crecientes en etapas más avanzadas de la enfermedad (Casasnovas *et al.* 2007). La causa del daño en el ADN espermático en los pacientes con linfoma de Hodgkin podría ser el estrés oxidativo, ya que se ha demostrado que se asocia con niveles elevados de citocinas

proinflamatorias, tales como IL-6 y TNF- α , en el semen (Tremellen 2008). Es posible que exista una etiología diferente detrás del daño en el ADN espermático observado en pacientes con cáncer testicular y en pacientes con linfoma de Hodgkin y, de hecho, se ha observado un aumento en la frecuencia de aneuploidías cromosómicas espermáticas en pacientes con linfoma de Hodgkin pero no en pacientes con cáncer testicular (Robbins *et al.* 1997; Fait *et al.* 2001).

El aumento en el nivel de SDF observado en los pacientes con otros tipos de cáncer diferentes del cáncer testicular y el linfoma de Hodgkin, también podría ser debido al efecto sistémico de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la presencia de cáncer (independientemente del origen) está afectando a la calidad del ADN espermático y podría ser una causa de infertilidad temporal. Aun así, teniendo en cuenta que existe la posibilidad de que los pacientes sometidos a terapias contra el cáncer permanezcan estériles tras meses o años de haber sido curados (Meseguer *et al.* 2003; Smit *et al.* 2010), la criopreservación de espermatozoides antes del tratamiento parece ser la mejor opción para que pacientes con cáncer puedan preservar su fertilidad. En este estudio, se realizaron 30 ciclos de ICSI con las muestras congeladas de los pacientes con cáncer, con un resultado de 15 embarazos; sin embargo, obviamente este es un número de pacientes muy bajo para obtener conclusiones acerca de la relevancia de la SDF en el éxito en reproducción asistida en pacientes con cáncer.

Objetivo 5.

Estudio del efecto de la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* sobre la fragmentación del ADN espermático.

La infección por *Chlamydia trachomatis* es una de la principales causas de subfertilidad tanto en hombres como en mujeres (World Health Organization 2001), aunque no está claro el mecanismo por el cual ocurre esto. Existen evidencias contradictorias acerca de la influencia de *Chlamydia trachomatis* sobre la función espermática. El presente estudio se centró, principalmente, en determinar si la infección *in vivo* por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* afectaba a la integridad del ADN espermático y a los parámetros seminales tradicionales. Además, se evaluó la influencia de la terapia con antibióticos sobre estos marcadores de calidad seminal.

Efecto de la infección por Chlamydia trachomatis y Mycoplasma sp. sobre los parámetros seminales

Todos los pacientes infectados por *Chlamydia trachomatis* (n = 143) también fueron positivos para diferentes concentraciones de *Mycoplasma sp.* Los parámetros seminales del grupo control y de los pacientes infectados se muestran en la Tabla 6. No se encontraron diferencias en cuanto a volumen, pH, color y viscosidad. La concentración, la movilidad y la morfología espermáticas estaban significativamente afectadas en pacientes, siendo 1,7, 1,8 y 1,1 veces inferiores al control, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el grupo control en cuanto a la vitalidad. A pesar de las diferencias observadas entre el grupo control y el grupo de pacientes, debemos señalar que, de acuerdo con los valores estándar de referencia de la OMS (World Health Organization 1999), el 72,7% de los pacientes infectados eran normozoospermicos y el 24,5% fueron clasificados como teratozoospermicos. El resto de las categorías anormales eran despreciables. Así, la mayoría de los pacientes infectados mostraron parámetros seminales normales. Los pacientes presentaban 5,2 veces más leucocitos que los controles fértiles. Sin embargo, todas las muestras de los pacientes, excepto una, estaban por debajo del umbral de leucocitospermia (1×10^6 leucocitos/ml).

Hay un debate abierto acerca de los efectos de la infección por *Chlamydia trachomatis in vivo* sobre los parámetros seminales estándar. Veznik *et al.* (2004) publicaron una influencia negativa de la infección sobre el volumen del eyaculado, la concentración espermática, la movilidad, la velocidad y la morfología. Otros autores también encuentran algún parámetro afectado, aunque no todos (Cengiz *et al.* 1997; Gdoura *et al.* 2001; Jakiel *et al.* 2004; Bezold *et al.* 2007). Sin embargo, otros autores no encuentran tal asociación

(Weidner *et al.* 1996; Habermann & Krause 1999; Ochsendorf *et al.* 1999; Vigil *et al.* 2002; Hosseinzadeh *et al.* 2004; de Barbeyrac *et al.* 2006; Motrich *et al.* 2006; Gdoura *et al.* 2008; Günyeli *et al.* 2011). Nuestros resultados concuerdan, de alguna manera, con los resultados de todos estos estudios. Nosotros observamos que los parámetros seminales estándar estaban afectados, aunque levemente, con respecto a los controles fértiles, pero, aun así, la mayoría de los valores estaban dentro del rango de referencia de los parámetros de la OMS (World Health Organization 1999). Así, como confirmaron Idahl *et al.* (2004), la posible influencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* sobre la fertilidad masculina no parece estar mediada por alteraciones en la concentración, la movilidad, la morfología y la vitalidad de los espermatozoides.

Muestras	Concentración	Movilidad (%)	Morfología (%)	Vitalidad (%)	Leucocitos
Control (n = 50)	74,71×10 ⁶ ± 33,63×10 ⁶	73,28 ± 8,79	32,11 ± 3,68	78,46 ± 21,46	14285,71 ± 35634,83
Pacientes (n = 143)	44,06×10 ⁶ ± 24,33×10 ⁶	66,86 ± 11,41	18,15 ± 5,38	78,77 ± 20,54	74475,52 ± 124026,80
<i>p</i>	< 0,001	< 0,010	< 0,001	NS	< 0,001

Tabla 6. Parámetros seminales convencionales de los controles fértiles y de los pacientes con infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*

Efecto de la infección por Chlamydia trachomatis y Mycoplasma sp. sobre la fragmentación del ADN espermático

El test SCD demostró que el porcentaje medio de células espermáticas con el ADN fragmentado en el grupo de pacientes (35,2% ± 13,5%) fue 3,2 veces mayor que el del grupo de controles fértiles (10,8% ± 5,6%) (Figura 28). Así, en términos relativos, la integridad del ADN parece ser el parámetro más afectado de los analizados que corresponden a la propia célula espermática. A diferencia del grupo control, los pacientes infectados mostraron una correlación negativa significativa entre la SDF y la concentración de espermatozoides ($r = -0,31$; $p < 0,0001$), la movilidad ($r = -0,40$; $p < 0,0001$), la morfología ($r = -0,36$; $p < 0,0001$) y la vitalidad ($r = -0,26$; $p = 0,001$). Cuando los pacientes fueron divididos en normozoospermicos o con parámetros seminales anormales, se observaron diferencias significativas en la

frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado ($33,1\% \pm 12,8\%$ vs. $40,9\% \pm 13,9\%$; U de Mann-Whitney U, $p = 0,002$).

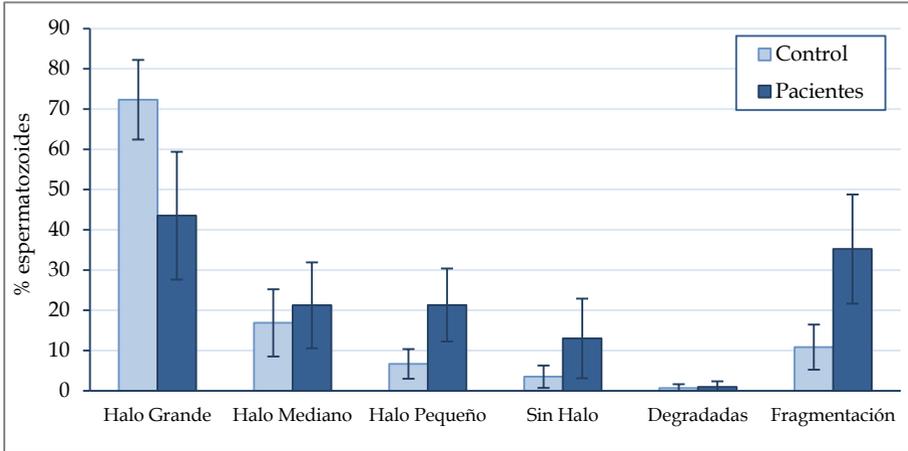


Figura 28. Porcentajes de células espermáticas de las diferentes categorías de tamaño de halo de acuerdo con el test SCD en el grupo de controles fértiles y en los pacientes infectados por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*

Ciertos estudios *in vitro* han demostrado que la coincubación de espermatozoides con *Chlamydia trachomatis* o su lipopolisacárido induce apoptosis. Eley *et al.* (2005a) coincubaron espermatozoides de hombres normozoospermicos con el lipopolisacárido extraído de *Chlamydia trachomatis* y observaron un aumento en el porcentaje de espermatozoides apoptóticos de un 5%, en el control, a un 25%, en el grupo tratado, aunque la presencia de marcadores típicos de apoptosis, como anexina V, Fas, Bcl-x, o p53, en espermatozoides no es estrictamente un signo de fragmentación del ADN (Sakkas *et al.* 2002; de Vries *et al.* 2003; Sakkas *et al.* 2003). Satta *et al.* (2006) observaron que la coincubación de espermatozoides móviles con cuerpos elementales (la forma infecciosa de la bacteria) de *Chlamydia trachomatis* daba lugar a externalización de fosfatidil serina en la membrana y SDF. Tras 6 h de incubación, ya observaron un incremento significativo en la SDF, sin embargo, no observaron un incremento significativo en las células anexina V positivas hasta 24 h después del inicio del experimento y con concentraciones relativamente altas del microorganismo. Nuestro estudio, utilizando el test SCD, demuestra que hay una frecuencia 3,2 veces mayor de células espermáticas con el ADN fragmentado que en los controles fértiles y que éste es el parámetro seminal más afectado relativamente. A diferencia del grupo de controles fértiles, en el caso de pacientes infectados,

cuanto mayor es la fragmentación del ADN, mayor es el descenso en la concentración, la movilidad, la morfología y la vitalidad. Esto sugiere que las frecuencias basales normales de SDF son independientes de los otros parámetros seminales. Sin embargo, en pacientes infectados, las correlaciones entre la SDF y los cambios en los otros parámetros seminales podrían atribuirse a la infección.

A pesar de que los estudios de coincubación *in vitro* descritos previamente demuestran claramente que *Chlamydia trachomatis* juega un papel directamente sobre la inducción de la SDF, el origen de la fragmentación del ADN *in vivo* podría ser más compleja. La reacción inflamatoria, tanto aguda como crónica, en el tracto genital masculino, puede dar lugar a un estrés oxidativo por sobreproducción de ROS. Estas podrían dañar el ADN espermático directamente o inducir una respuesta apoptótica que resulte en la fragmentación del ADN (Sawyer *et al.* 2003; Koppers *et al.* 2011).

Los leucocitos pueden liberar ROS o pueden estimular su producción por parte de los espermatozoides. En nuestro estudio, aunque los pacientes infectados presentaron 5,2 veces más leucocitos que los controles fértiles, estos valores estaban por debajo del umbral de leucocitospermia de la OMS (World Health Organization 1999). Sin embargo, su influencia en la producción de niveles anormales de ROS podría ser importante, especialmente cuando la infección se presenta de forma crónica. De hecho, Henkel *et al.* (2005) sugirieron que el valor umbral de 1×10^6 leucocitos/ml debería ser reevaluado, ya que cantidades menores de leucocitos pueden afectar a la integridad del ADN. Por otro lado, el lipopolisacárido de *Chlamydia trachomatis* también podría afectar a la célula espermática a través de la inducción de una producción excesiva de ROS por parte de los espermatozoides, aumentando así el estrés oxidativo (Eley *et al.* 2005b). Finalmente, la infección simultánea de *Mycoplasma sp.* podría interactuar con *Chlamydia trachomatis* a la hora de producir daño en el ADN (Núñez-Calonge *et al.* 1998; Potts *et al.* 2000).

Influencia del tratamiento con antibióticos sobre la fragmentación del ADN de espermatozoides de pacientes infectados con Chlamydia trachomatis y Mycoplasma sp.

Para evaluar la influencia del tratamiento, se estudió un grupo de 95 pacientes tras la terapia con antibióticos y antiinflamatorios ($3,8 \pm 2,2$ meses).

De los parámetros seminales estándar, sólo la morfología mostró una clara mejoría como resultado de la terapia (Tabla 7). El porcentaje medio de mejora relativa con respecto al control fue del 40,36% (un valor del 100% significaría que, tras la terapia, los pacientes alcanzaron el mismo valor que los controles). La concentración espermática y la movilidad no mejoraron significativamente. La frecuencia media de células espermáticas con el ADN fragmentado descendió de $37,7 \pm 13,6\%$ a $24,2 \pm 11,2\%$ (test de Wilcoxon, $p < 0,0001$), lo cual refleja una mejora de un 50,2% tras la terapia (Figura 29). Dentro del grupo de 95 hombres, sólo en 8 no varió significativamente la frecuencia de células espermáticas con el ADN fragmentado, y en 1 empeoró. Así, la SDF fue el parámetro que mostró una mayor mejora relativa tras la terapia. Ningún parámetro seminal alcanzó los valores del grupo control.

Muestras (n = 95)	Concentración	Movilidad (%)	Morfología (%)	Vitalidad (%)	Leucocitos
Antes tratamiento	$43,67 \times 10^6 \pm$	$66,96 \pm$	$17,14 \pm 4,50$	$79,59 \pm$	$67368,42 \pm$
	$22,16 \times 10^6$	10,32		9,50	75360,28
Después tratamiento	$44,85 \times 10^6 \pm$	$68,39 \pm$	$23,17 \pm 4,83$	$79,65 \pm$	$68947,37 \pm$
	$20,71 \times 10^6$	9,23		11,32	137062,45
p	NS	NS	< 0,001	NS	NS

Tabla 7. Parámetros seminales convencionales de pacientes con infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp*, antes y después del tratamiento con antibióticos.

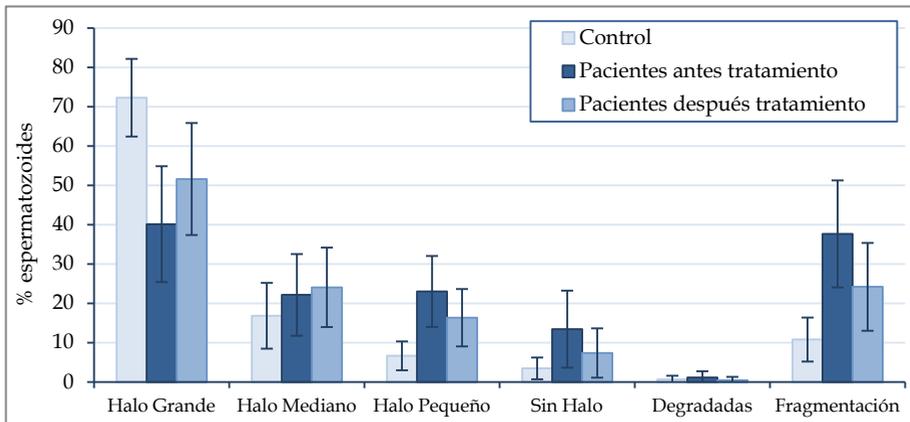


Figura 29. Porcentajes de células espermáticas de las diferentes categorías de tamaño de halo, de acuerdo con el test SCD, en el grupo control y en el grupo de pacientes infectados por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp*, antes y después del tratamiento con antibióticos.

El seguimiento de los pacientes tras la terapia fue irregular, tanto en intervalo de tiempo entre muestreo como en número de muestras. Sin embargo, cuando dividimos el tiempo tras la terapia en grupos de meses, se hizo evidente que la mejora era más pronunciada durante los tres primeros meses después de empezar tratamiento ($p < 0,001$). El resultado fue el mismo para la morfología y para la frecuencia de células espermáticas con el ADN fragmentado.

La terapia antibiótica tuvo éxito descendiendo el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado, lo cual confirma la influencia de la infección en la integridad del ADN espermático humano.

Efecto de la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* sobre la probabilidad de obtener embarazo

Aunque sería necesario un mayor número de pacientes para obtener conclusiones acerca de la relevancia de la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* en la probabilidad de obtener embarazo, de manera preliminar, se determinó el resultado en fertilidad en un grupo de 30 pacientes. De las parejas que intentaron embarazo durante el curso del tratamiento antibiótico (seis semanas como mínimo) ($n = 16$), sólo el 12,5% lo consiguieron. Sin embargo, de las parejas que lo intentaron de tres a seis semanas después del tratamiento ($n = 14$), el 85,7% tuvieron éxito ($r: 0,73$, $p < 0,0001$; test χ^2 , $p < 0,0001$). Siete parejas consiguieron embarazo espontáneamente, sin ningún tipo de estimulación ovárica o técnica de reproducción asistida, y cinco tras IUI. Cuando comparamos ambos grupos, no encontramos diferencias significativas en concentración, movilidad y vitalidad. Sólo encontramos diferencias significativas en la frecuencia de células espermáticas con el ADN fragmentado y en la morfología espermática normal (Tabla 8). Así, el descenso en la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado, a consecuencia de la terapia, podría ser relevante para mejorar las tasas de embarazo en pacientes con infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*

El hecho de que la terapia antibiótica haya tenido éxito descendiendo el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado confirma la influencia de la infección en la integridad del ADN del esperma humano. Además, en un pequeño grupo, se observó un aumento de la tasa de embarazo después del tratamiento, lo cual sugiere que la mejoría en la

integridad del ADN de las células espermáticas tras la terapia podría ser un factor relevante para conseguir embarazo. Es más, podría ser un parámetro útil para controlar la efectividad de la terapia, aunque sería necesario un trabajo más extenso para confirmar estos datos.

Muestras	Concentración	Movilidad (%)	Vitalidad (%)	Morfología (%)	Fragmentación (%)	Consiguen embarazo
Durante tratamiento (n = 16)	39,19×10 ⁶ (± 17,99×10 ⁶)	63,44 (± 17,20)	78,75 (± 10,12)	16,00 (± 3,8)	43,30 (± 14,1)	12,5%
Después tratamiento (n = 14)	54,67×10 ⁶ (± 26,67×10 ⁶)	69,14 (± 7,67)	81,07 ± 3,73	18,80 (± 3,3)	32,20 (± 7,6)	85,7%
p	NS	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,0001

Tabla 8. Parámetros seminales convencionales, porcentaje de células con el ADN fragmentado y porcentaje de parejas que consiguen embarazo, durante y después del tratamiento para la infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*

Todavía no se conoce bien la patogénesis de la infección genitourinaria causada por *Chlamydia trachomatis*. Recientemente han surgido evidencias de que una familia multigénica de 9 proteínas de membrana, denominadas proteínas polimórficas de membrana (PMPs), podría desempeñar un papel importante en el proceso de infección y contribuir a la variabilidad en el curso y el resultado de la infección (Taylor *et al.* 2011). Es más, una de estas proteínas (PMPD), ha sido propuesta como posible diana para la creación de una vacuna (Crane *et al.* 2006). Si esto tiene éxito, podría ser interesante analizar su influencia en la calidad espermática y, especialmente, en la integridad del ADN espermático, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En general, nuestros resultados sugieren que el papel del daño en el ADN espermático sobre la posible infertilidad producida por la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* podría ser más significativo que el del resto de parámetros seminales.

Objetivo 6.

Cuantificación del efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre el resultado en reproducción asistida.

La integridad genética del gameto masculino ha de ser esencial para que un embarazo llegue a término con éxito y de manera saludable. La frecuencia de espermatozoides con fragmentación en el ADN es un marcador de la calidad espermática y podría servir para predecir fertilidad (Bungum *et al.* 2007). La influencia de la SDF sobre la fertilidad se ilustra bien en modelos animales, tales como el ratón (Fernández-González *et al.* 2008). Sin embargo, en el caso de los seres humanos, hay una gran disparidad entre los resultados de diferentes estudios que tratan de correlacionar la SDF con los resultados en reproducción (Zini 2011). Cuando se analiza la integridad del ADN espermático y su relación con la calidad embrionaria y el éxito en FIV, debería tenerse en cuenta el factor femenino. La donación de ovocitos es una herramienta útil para estudiar la calidad del ADN espermático utilizado en los tratamientos de reproducción asistida, ya que, en teoría, reduce la variabilidad en la reparación del ADN, asociada a la calidad del ovocito y la infertilidad femenina. De hecho, la capacidad de los ovocitos para reparar las roturas en el ADN espermático podría ser una de las razones de esas discrepancias al tratar de correlacionar la SDF con la fertilidad. Además de la calidad del ovocito, existen otros factores que podrían afectar a la interpretación de los resultados. En este estudio hemos tratado de cuantificar el efecto de la SDF sobre la fertilidad, evaluando los factores de sesgo más significativos que podrían enmascarar el efecto real de la SDF. Los factores de sesgo evaluados fueron: el origen de la muestra (fresca o congelada-descongelada), el procedimiento de inseminación utilizado (FIV o ICSI) y la calidad de los ovocitos (ovocitos de donantes jóvenes y fértiles u ovocitos de pacientes infértiles).

La edad media de los pacientes de este estudio fue de 38,78 (\pm 5,99) años. La edad media de la población femenina fue de 37,85 (\pm 5,45) años. La etiología de la infertilidad femenina fue: baja calidad de los ovocitos en 36,2% (n = 76) de los casos, edad materna avanzada en 33,3% (n = 70) de los casos, fallo ovárico prematuro en 10,5% (n = 22) de los casos, normal en 7,6% (n = 16) de los casos, obstrucción tubárica en 4,8% (n = 10) de los casos, baja respuesta ovárica en 4,3% (n = 9) de los casos, y factor de infertilidad masculino severo en 3,3% (n = 7) de los casos.

Efecto combinado del proceso de congelación-descongelación del espermatozoides y del uso de la técnica de swim-up sobre los niveles de fragmentación del ADN espermático

Cuando se estudió el efecto del *swim-up* sobre la SDF, se observó una reducción estadísticamente significativa de 36,83% ($\pm 1,60$) a 15,84% ($\pm 1,60$), después de la selección por *swim-up* ($p < 0,001$). El proceso de congelación-descongelación del semen no aumentó de manera significativa la SDF. Sin embargo, cuando se analizaron estos dos procesos en conjunto, se observó que el descenso de la SDF tras *swim-up* era mucho menos intenso cuando se utilizaban muestras que habían sido congeladas-descongeladas que cuando se utilizaban muestras frescas (Figura 30).

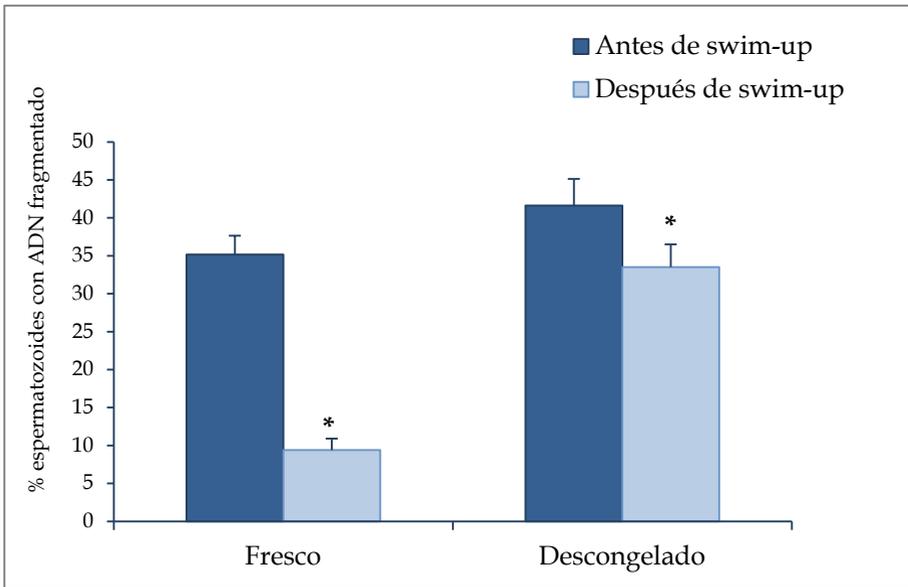


Figura 30. Porcentaje de células con el ADN fragmentado con respecto al origen de la muestra (fresca o congelada-descongelada). También se representan los valores de fragmentación antes y después de la preparación de la muestra para reproducción asistida mediante la técnica de *swim-up*. *Diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$.

Los altos niveles de fragmentación observados tras el *swim-up* en las muestras congeladas-descongeladas con respecto a las muestras frescas sugieren que, aunque el proceso de congelación-descongelación no afecta directamente a la integridad del ADN, aumenta la susceptibilidad del ADN a ser dañado durante el proceso de preparación del semen para ser utilizado en las técnicas de reproducción asistida. Estas observaciones resaltan la

importancia de reducir al mínimo el tiempo de manejo de las muestras espermáticas *ex vivo* antes de proceder a su utilización para la fecundación. A este respecto, Núñez-Calonge *et al.* (2012) proponen que se estudie el daño en el ADN espermático justo en el momento de la fecundación. Esta práctica normalizaría los resultados entre diferentes laboratorios a la vez que aportaría datos más exactos y precisos para analizar el impacto negativo de la SDF.

Por otro lado, estos resultados indican que en el análisis estadístico debemos considerar de manera separada la SDF en muestras frescas y en muestras congeladas-descongeladas y también independientemente antes y después de *swim-up*.

Efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre la probabilidad de obtener embarazo utilizando la calidad del ovocito como factor de sesgo

Para determinar el efecto de la SDF sobre la probabilidad de obtener embarazo, utilizando la calidad del ovocito como un factor de sesgo, se llevó a cabo un análisis estratificado. Se definieron dos grupos: 1) un grupo en el que se habían empleado los ovocitos de las pacientes infértiles y 2) un grupo en el que se habían empleado ovocitos de donantes jóvenes y fértiles. El origen de la muestra (fresca o congelada-descongelada) y el procedimiento utilizado para la fecundación (FIV o ICSI) fueron evaluados como posibles factores de confusión en ambos grupos. No se encontraron diferencias significativas entre las tasas de embarazo obtenidas con muestras frescas y las obtenidas con muestras congeladas-descongeladas ni entre las tasas de embarazo obtenidas con FIV y las obtenidas con ICSI, en ninguno de los grupos estudiados (ovocitos propios o de donantes) (Tabla 9). Tampoco se encontró ninguna relación estadística entre los parámetros analizados como posibles factores de confusión y la SDF, en ninguno de los grupos estudiados (ovocitos propios o de donantes) (Tabla 10). Estos factores también se analizaron mediante regresión logística para determinar cómo modificaban el efecto de la SDF sobre la tasa de embarazo, obteniendo que ni el origen de la muestra ni el procedimiento de fecundación eran factores de confusión, ya que el efecto de la SDF sobre la tasa de embarazo no se veía modificado por ellos, en ninguno de los grupos estudiados (ovocitos propios o de donantes). Este análisis se realizó utilizando los porcentajes de fragmentación obtenidos antes y después de la selección de las muestras por *swim-up* y el resultado fue el mismo en ambos casos.

Ciclo	Fresco	Descongelado	<i>p</i> valor	FIV	ICSI	<i>p</i> valor
Ovocitos propios	53,8% (50 de 93)	60,0% (3 de 5)	NS	50,0% (4 de 8)	54,4% (49 de 90)	NS
Ovocitos de donantes	56,6% (34 de 60)	55,8% (29 de 52)	NS	61,9% (13 de 21)	54,9% (50 de 91)	NS

Tabla 9. Variaciones en las tasas de embarazo en los diferentes grupos analizados. NS: estadísticamente no significativo.

Ciclo	<i>Swim-up</i>	Fresco	Descongelado	<i>p</i> valor	FIV	ICSI	<i>p</i> valor
Ovocitos propios	Antes	31,0% (± 18,0)	26,2% (± 16,6)	NS	25,3% (± 19,3)	31,1% (± 17,8)	NS
	Después	9,5% (± 13,9)	12,1% (± 10,3)	NS	11,6% (± 10,0)	9,6% (± 13,9)	NS
Ovocitos de donantes	Antes	42,4% (± 23,6)	43,7% (± 19,9)	NS	38,8% (± 27,5)	43,9% (± 20,6)	NS
	Después	19,3% (± 14,6)	36,5% (± 26,1)	NS	14,1% (± 11,7)	23,1% (± 26,4)	NS

Tabla 10. Variaciones en la fragmentación del ADN espermático en los diferentes grupos analizados. Los resultados se dan en media (± desviación estándar). NS: estadísticamente no significativo.

Con los resultados del análisis estratificado, se definió un modelo de regresión logística para evaluar el efecto de la SDF (medida antes y después de *swim-up*) sobre la probabilidad de obtener embarazo. Este análisis se repitió para estudiar el efecto de la fragmentación sobre la probabilidad de aborto (Tabla 11). No se tuvieron en cuenta el origen de la muestra ni el procedimiento de fecundación, ya que el análisis estadístico demostró que no eran factores de confusión. En el caso del grupo de pacientes infértiles que utilizaron ovocitos propios, se observó que la SDF tenía un impacto negativo estadísticamente significativo sobre la probabilidad de obtener un embarazo. Como resultado de este análisis, se cuantificó el efecto de la SDF sobre la probabilidad de obtener un embarazo y se estableció que por cada 10% de aumento en la SDF, la probabilidad de no conseguir embarazo se multiplicaba por 1,31 (aumentaba un 31%). Por el contrario, en el caso de las

pacientes que usaron ovocitos de donantes fértiles, no fue posible cuantificar el efecto de la SDF sobre el resultado en reproducción, debido a la falta de significación estadística del modelo.

Resultado de los ciclos	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	R ² Nagelkerke	Significación estadística
Ovocitos propios				
Embarazo	0,973	0,948 - 0,999	0,069	0,037
Aborto	1,002	0,968 - 1,037	0,000	0,908
Ovocitos de donantes				
Embarazo	0,991	0,971 - 1,010	0,013	0,381
Aborto	1,012	0,988 - 1,036	0,017	0,343

Tabla 11. Análisis de regresión logística del efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre la probabilidad de obtener un embarazo o sufrir un aborto en ciclos de FIV realizados con ovocitos propios de las pacientes y en ciclos realizados con ovocitos de donantes.

Los resultados obtenidos indican que el efecto de la SDF sobre la probabilidad de obtener embarazo puede ser calculado independientemente del procedimiento de fecundación empleado o del origen de la muestra. Sin embargo, la calidad del ovocito sí condiciona el efecto de la SDF. Mientras que en mujeres con ovocitos de mala calidad, la SDF disminuye la probabilidad de obtener un embarazo, en mujeres con ovocitos de buena calidad no tiene significación clínica. Estos resultados sugieren que, aunque el espermatozoide maduro no tiene capacidad de reparación, tras la fecundación, el ovocito todavía puede reparar, al menos en parte, el daño que porta el espermatozoide en su ADN y que esta reparación es más efectiva en ovocitos de buena calidad pertenecientes a donantes jóvenes. Así, un ovocito de buena calidad podría superar el impacto negativo de la SDF sobre la probabilidad de obtener un embarazo. De hecho, el grupo de pacientes que utilizó ovocitos de donantes consiguió embarazos con valores de SDF más altos que el grupo que utilizó ovocitos propios, tanto si la SDF se evaluaba antes de la selección de espermatozoides por *swim-up* ($41,1\% \pm 21,0$ vs $27,0\% \pm 16,1$), como si se evaluaba después ($24,7\% \pm 27,1$ vs $8,6\% \pm 13,3$). Estos resultados podrían estar relacionados con el “efecto iceberg”

(Evenson *et al.* 2002). Según este modelo, los espermatozoides con una gran cantidad de daño en su ADN, el cual podríamos detectar fácilmente con las técnicas existentes, constituirían la punta del “iceberg”. Estos espermatozoides serían incapaces de producir un embrión viable, incluso cuando fertilizaran un ovocito de buena calidad. El resto de los espermatozoides podría contener algún daño en el ADN, no detectable con las técnicas actuales, que podría ser reparado por el ovocito, aunque su correcta reparación dependería de la calidad del ovocito.

Poco después de la publicación de los resultados de este estudio, Núñez-Calonge *et al.* (2012) publicaron un estudio similar en el que evaluaban el impacto de la SDF en un grupo de pacientes que se habían sometido a ICSI utilizando ovocitos de donantes y observaron una influencia negativa de la SDF sobre la probabilidad de obtener embarazo. En el estudio de Núñez-Calonge *et al.* (2012) evaluaron la SDF justo en el momento en el que se producía la inyección del espermatozoide. En el estudio que se presenta en esta tesis, la SDF se evaluó antes y justo después de la selección de espermatozoides por *swim-up* y, en ninguno de los casos, se observó un efecto significativo de la SDF sobre la probabilidad de obtener embarazo en el caso de las pacientes que utilizaron ovocitos de donantes fértiles. Dado que desde que se seleccionan los espermatozoides hasta que se utilizan para FIV o ICSI no pasa más de media hora, no parece que ésta sea la razón de las diferencias entre los resultados de los dos estudios. De hecho, en un estudio posterior, llevado a cabo por el mismo grupo de investigación, realizado también en pacientes que se habían sometido a ICSI con ovocitos de donantes fértiles, se comparó el potencial para predecir embarazo de evaluar la SDF antes de la selección de espermatozoides por *swim-up* y después y se demostró que los datos derivados del estudio de la SDF antes de realizar el *swim-up* y los obtenidos después tenían el mismo valor predictivo (Gosálvez *et al. in press*). En este trabajo, Gosálvez *et al. (in press)* proponen que el hecho de que el análisis de la SDF tras realizar el *swim-up* no aumente el poder predictivo podría ser atribuido al “efecto iceberg”, aunque ellos añaden una modificación al modelo propuesto originalmente por Evenson *et al.* (2002). Inicialmente, este modelo proponía que entre los espermatozoides que constituían la punta del “iceberg” y esa otra población de espermatozoides con daño no detectable con las técnicas actuales, existía una fuerte correlación positiva. Esto explicaba los resultados obtenidos en sus estudios, en los que concluían que, cuando la SDF de una muestra era mayor del 30%, la probabilidad de obtener un embarazo sería próxima a cero (Evenson *et al.* 1999; Evenson *et al.* 2002). Estudios posteriores no sólo demuestran que sí es

posible obtener embarazos con valores altos de SDF (Gandini *et al.* 2004; Payne *et al.* 2005), sino que aportan resultados contradictorios en cuanto a si existe o no una correlación entre la SDF y la probabilidad de obtener embarazo, sobre todo en ICSI (Zini 2011). Esto hace que el modelo del “efecto iceberg” pierda fuerza. Aun así, lo que está claro es que si una muestra de espermatozoides con un cierto porcentaje de SDF no puede dar lugar a embarazo, incluso con ovocitos de buena calidad, ha de ser porque el resto de la población de espermatozoides presenta algún tipo de daño que les hace no aptos para lograr un embarazo. Gosálvez *et al.* (in press) sugieren que no tiene por qué existir una correlación positiva entre los espermatozoides de la punta del “iceberg” y la proporción de espermatozoides con daño no detectable, es decir, podrían existir pacientes con un nivel bajo de SDF detectable pero con un alto porcentaje de espermatozoides con daño no detectable. De la misma manera, un paciente podría tener un nivel alto de SDF pero una baja proporción de espermatozoides con daño no detectable. También se podría dar el caso de pacientes con niveles similares de SDF pero con diferentes proporciones de espermatozoides con daño no detectable. Este interesante matiz que Gosálvez *et al.* (in press) introducen en el modelo del “efecto iceberg” podría explicar las diferencias existentes entre sus trabajos (Núñez-Calonge *et al.* 2012; Gosálvez *et al.* in press) y el que se presenta en esta tesis. Por otro lado, aunque los ovocitos utilizados en estos experimentos eran, supuestamente, de buena calidad, podrían existir diferencias en la capacidad para reparar el ADN. Además, podrían existir diferencias en cuanto a procedimientos entre diferentes clínicas que también podrían contribuir a las diferencias en los resultados de estos estudios.

El conocimiento adquirido en el campo de la mutagénesis para diferentes tipos celulares ha demostrado que, cuando el daño en el ADN es considerable, algunas lesiones son imposibles de reparar o se producen errores en la reparación. Es probable que ocurra lo mismo cuando un ovocito es fecundado por un espermatozoide que tiene el ADN totalmente fragmentado. Si los espermatozoides portan sólo una leve cantidad de daño en el ADN, el ovocito podría ser capaz de repararlo, pero el alcance de la reparación dependería de la calidad del ovocito, que, a su vez, depende de la edad de la paciente y del entorno ovárico. Así, un fallo en el desarrollo embrionario podría ocurrir como resultado de un fallo en la reparación del ADN espermático por parte del ovocito.

Estudios realizados en modelos animales demuestran que existe una clara influencia de la SDF sobre la fertilidad. Fernández-González *et al.* (2008), en un estudio experimental realizado en ratones, demostraron que cuando se llevaba a cabo ICSI utilizando semen con un alto porcentaje de células con el ADN fragmentado se reducía la tasa de desarrollo del embrión antes de la implantación y se producía un menor número de descendientes. Además, demostraron que una proporción significativa de descendientes mostraban anomalías en test de comportamiento y presentaban malformaciones, tumores y envejecimiento prematuro. En otro estudio reciente, realizado también en ratones, Gawecka *et al.* (2013) demuestran que el cigoto responde al daño en el ADN espermático a través de un mecanismo no apoptótico que actúa retardando la replicación del ADN paterno y en última instancia conduce a la interrupción del desarrollo embrionario. En el caso de humanos, a pesar de la influencia de la SDF sobre la fecundación y la calidad embrionaria (Muriel *et al.* 2006a), es probable que la selección de espermatozoides y embriones que se realiza en FIV o ICSI disminuya el impacto negativo de la fragmentación sobre la probabilidad de obtener embarazo. En este trabajo, se observó que la SDF tenía un efecto estadísticamente significativo sobre la probabilidad de obtener un embarazo cuando se empleaban ovocitos de mujeres infértiles, a pesar de que se hubiera llevado a cabo la selección de espermatozoides y embriones. Es lógico suponer que, en ausencia de estos procesos de selección, la influencia de la SDF sobre la probabilidad de obtener un embarazo podría ser más fuerte.

Diversos estudios en los que se han utilizado diferentes técnicas para detectar el daño en el ADN espermático han sugerido diferentes valores umbral, para el porcentaje de espermatozoides con el ADN dañado, por encima de los cuales la fecundación y la capacidad de desarrollo se verían afectadas (Evenson & Wixon 2006a; Benchaib *et al.* 2007; Bungum *et al.* 2007; Núñez-Calonge *et al.* 2012). En este estudio, se llevó a cabo un análisis de las curvas ROC para determinar las propiedades predictivas de la SDF con respecto a la probabilidad de obtener embarazo. Este análisis reveló una ausencia de poder predictivo tanto si la fragmentación se evaluaba antes de *swim-up* como si se evaluaba después. El resultado fue el mismo en el grupo de pacientes que utilizaron ovocitos propios y en el grupo que utilizaron ovocitos de donantes (Tabla 12), con lo cual no se ha podido establecer este valor umbral que permita predecir, a partir del porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado, si se obtendrá o no un embarazo. Sin embargo, Núñez-Calonge *et al.* (2012), utilizando el modelo de donantes

de ovocitos en un grupo de pacientes sometidos a ICSI y evaluando la SDF justo en el momento en el que se produce la inyección del espermatozoide, sí han sido capaces de determinar un valor umbral de SDF (17%) para predecir embarazo (77,8% sensibilidad y 71,1% especificidad) en el conjunto de datos que estudiaron. Valores de SDF por debajo del 17% resultaron en una tasa de embarazo del 84,2%, mientras que con valores de SDF por encima del 17% se obtuvo una tasa de embarazo de 38,2% (13 de 34 casos). A pesar de la alta capacidad de predicción del modelo, llama la atención el relativamente alto número de casos que consiguen embarazo con un valor de SDF por encima del umbral. De los 13 de 34 casos que consiguen embarazo con valores de SDF por encima del 17%, 4 de ellos tenían valores de SDF por encima del 30%, de los cuales 2 tenían valores de SDF por encima del 40%. En un estudio posterior, en el que se utilizó el mismo modelo experimental, Gosálvez *et al.* (*in press*) obtienen resultados muy similares. En este caso, determinaron el poder predictivo de la SDF analizada antes y después de *swim-up* y obtuvieron un valor umbral de 17,5% (81% sensibilidad y 73% especificidad) cuando utilizaron los valores de SDF analizados tras la selección por *swim-up* y de 26% (75% sensibilidad y 65% especificidad) cuando utilizaron los valores de SDF del semen en fresco. En términos de predicción, un valor de SDF, evaluado tras *swim-up*, menor del 17,5% representó una tasa de embarazo de 64,2% y un valor mayor del 17,5% representó una tasa de embarazo del 42,9%. De la misma manera, un valor de SDF, evaluado en el semen en fresco, menor del 26% representó una tasa de embarazo de 80,0% y un valor mayor del 26% representó una tasa de embarazo del 54,1%. Estos dos estudios (Núñez-Calonge *et al.* 2012; Gosálvez *et al.* *in press*) sólo analizan el impacto de la SDF sobre un grupo de pacientes sometidos a ICSI que utiliza ovocitos de buena calidad. No es posible, por lo tanto, comparar estos resultados con los que se hubieran obtenido de la misma manera pero en un grupo de pacientes con ovocitos de mala calidad. En el caso que aquí se presenta, se observa que la SDF media del grupo de individuos que consigue embarazo utilizando ovocitos de donantes es $41,1\% \pm 21,0$, si se evalúa antes de *swim-up*, o $24,7\% \pm 27,1$, si se evalúa después de *swim-up*. Mientras que, la SDF media del grupo de individuos que consigue embarazo utilizando ovocitos propios es $27,0\% \pm 16,1$, si se evalúa antes de *swim-up* o $8,6\% \pm 13,3$, si se evalúa después. El uso de ovocitos de donantes parece “aceptar” niveles de SDF más elevados. Esto, sumado al hecho de que en mujeres que utilizaron ovocitos de buena calidad la SDF no tiene significación clínica, mientras que en mujeres que utilizaron ovocitos de mala calidad sí la tiene, nos lleva a

concluir que un ovocito de buena calidad podría superar el impacto negativo de la SDF. Aunque, *a priori*, el uso de ovocitos de donantes parecía un modelo útil para reducir la variabilidad en la capacidad del óvulo para reparar el ADN espermático y de esta manera poder evaluar el impacto de la SDF sobre la probabilidad de obtener un embarazo, a la vista de estos resultados, el uso de ovocitos de mala calidad podría ser más útil cuando la intención es aislar el efecto de la SDF sobre la probabilidad de obtener un embarazo.

Ciclo	<i>Swim-up</i>	AUC (IC 95%)	Puntos de corte	Sensibilidad	Especificidad
Ovocitos propios	Antes	0,635 (0,521 – 0,738)	< 27,1%	64,4%	67,6%
	Después	0,518 (0,403 – 0,632)	< 9,7%	78,6%	40,5%
Ovocitos de donantes	Antes	0,559 (0,443 – 0,670)	< 28,5%	48,8%	67,6%
	Después	0,554 (0,434 – 0,670)	< 26,7%	35,1%	85,0%

Tabla 12. Propiedades predictivas de la fragmentación del ADN espermático sobre la probabilidad de obtener embarazo, mediante análisis de curvas ROC. AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza.

El valor de la SDF para predecir la fertilidad masculina podría aumentar con la determinación de parámetros adicionales que aporten más información. Por ejemplo, la dinámica de la SDF, es decir, el incremento de la tasa de fragmentación a lo largo del tiempo tras la eyaculación o la descongelación de la muestra, podría ser un factor importante a tener en cuenta (Gosálvez *et al.* 2009b).

Nuestros resultados indican que el ovocito juega un papel esencial en el destino final del embrión, ya que la reparación del ADN espermático depende de él y, aunque la SDF influye de manera negativa sobre la tasa de embarazo, éste es realmente un problema que combina el factor masculino (ADN dañado) y el femenino (capacidad para reparar el ADN). De esta manera, el daño en el ADN espermático sería un problema que surgiría como consecuencia de la infertilidad de origen mixto. Ésta podría ser una de

las principales razones de la disparidad existente entre diferentes estudios que tratan de correlacionar la SDF con la fertilidad. Es muy difícil aislar la influencia real de la SDF en los estudios clínicos ya que, aunque la integridad del ADN puede ser evaluada y contrastada, no se puede determinar la capacidad del ovocito para reparar el daño.

Objetivo 7.

Evaluación de la dinámica de la fragmentación del ADN espermático como indicador en toxicología reproductiva.

La SDF es un buen biomarcador en toxicología reproductiva, ya que se ha observado que la exposición de los testículos o de las células espermáticas a diferentes tóxicos, como estrés térmico, radiación ionizante, quimioterapia, pesticidas, contaminación ambiental, tabaco y ondas electromagnéticas de teléfonos móviles y otros dispositivos electrónicos, resulta en un aumento del daño en el ADN espermático (Perreault *et al.* 2003; Evenson & Wixon 2005; Agarwal *et al.* 2011; García-Contreras *et al.* 2011; Avendaño *et al.* 2012).

Estudios recientes indican que la SDF no es estable y que la frecuencia de células espermáticas con el ADN fragmentado tiende a aumentar con el tiempo tras la recogida de la muestra o tras descongelar las muestras congeladas (Gosálvez *et al.* 2009a; Gosálvez *et al.* 2009b; Jackson *et al.* 2010; Matsuura *et al.* 2010). Existen variaciones en la cinética de la SDF entre diferentes especies e incluso entre individuos de la misma especie (Gosálvez *et al.* 2009a; Gosálvez *et al.* 2011b), que podrían ser utilizadas como diagnóstico o como una medida para predecir fertilidad.

La dinámica de la SDF, es decir, la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado a lo largo del tiempo, evaluada mediante incubación *in vitro*, proporciona información importante sobre la evolución de la integridad del ADN en el espermatozoide maduro (Gosálvez *et al.* 2010). En este estudio, se incubaron muestras de semen de varios donantes con niveles tóxicos de determinados agentes y se analizó su efecto sobre la tasa de SDF (%SDF/tiempo) para probar la utilidad del estudio dinámico de la SDF en el contexto de la toxicología reproductiva. Las muestras de semen se expusieron *in vitro* a dosis crecientes de radiación ionizante, de SNP (un donante de NO[•]), a temperatura elevada y a un ambiente con pH ácido. Los espermatozoides fueron incubados para simular una exposición crónica (24 h de incubación a 37°C) y una exposición aguda a los diferentes agentes y así mejorar la relevancia clínica del procedimiento. Para evaluar el efecto de la radiación ionizante sobre la dinámica de la SDF, sólo se realizó la exposición aguda.

La hipótesis general de este estudio fue que el análisis dinámico de la SDF, tras la exposición de los espermatozoides a niveles tóxicos de ciertos agentes, podría revelar algún tipo de daño latente, originado a raíz de esta exposición, que no advertiríamos con una evaluación normal de la SDF.

Efecto de la exposición a la radiación ionizante

Los resultados obtenidos al comparar los porcentajes de SDF que presentaban las muestras inmediatamente después de ser sometidas a las diferentes dosis de radiación (0, 0,5, 1, 2, 5 y 10 Gy) indican que ninguna de las dosis estudiadas afectó a la SDF, en ninguno de los donantes estudiados (A - C). Al comparar las curvas de supervivencia obtenidas tras incubar a 37°C durante 24 h los espermatozoides tratados con las diferentes dosis de radiación, observamos que ninguna dosis de rayos-X, ni siquiera la de 10 Gy, modificó la dinámica de SDF normal del control, en ninguno de los donantes estudiados (Figuras 31, 32 y 33).

La hipertermia, durante y tras la radioterapia, es un reconocido radiosensibilizador (Hall & Giaccia 2006; Pandita *et al.* 2009; Tomita 2010). Por este motivo, se incubaron a 45°C durante 24 h otras alícuotas del semen irradiado de los mismos donantes (A - C). Tampoco en este caso se observaron diferencias al comparar las curvas de supervivencia de las diferentes dosis de radiación probadas, en ninguno de los donantes, indicando que la hipertermia tras la terapia no potencia de manera significativa el efecto de la radiación ionizante sobre la SDF. Lo que sí se observó fue que la incubación a 45°C aceleró significativamente la tasa de fragmentación en comparación con la incubación a 37°C ($p < 0,001$), en los tres donantes (Figuras 31, 32 y 33). Además, estas dinámicas de SDF a 45°C también fueron significativamente diferentes entre los diferentes individuos estudiados ($p < 0,001$).

En general, estos resultados indican que las dosis de radiación ionizante probadas no inducen SDF inicial ni tardía y que la alta temperatura afecta a la longevidad del ADN espermático, con un impacto variable dependiendo del individuo.

Los resultados obtenidos coinciden con los de otros autores (Sailer *et al.* 1995; Haines *et al.* 1998; Fernández *et al.* 2000; Cordelli *et al.* 2003) y confirman el alto grado de radioresistencia de los espermatozoides maduros, incluso cuando se estudia la SDF de un modo dinámico. El extremo empaquetamiento de la cromatina de los espermatozoides maduros podría reducir la capa de solvatación de agua que rodea las cadenas de ADN, disminuyendo así el ataque de radicales hidroxilo producidos por la radiolisis de las moléculas de agua cercanas al ADN. De hecho, es posible que el fuerte empaquetamiento que presenta el ADN de los espermatozoides pueda haber evolucionado para proporcionar una función protectora.

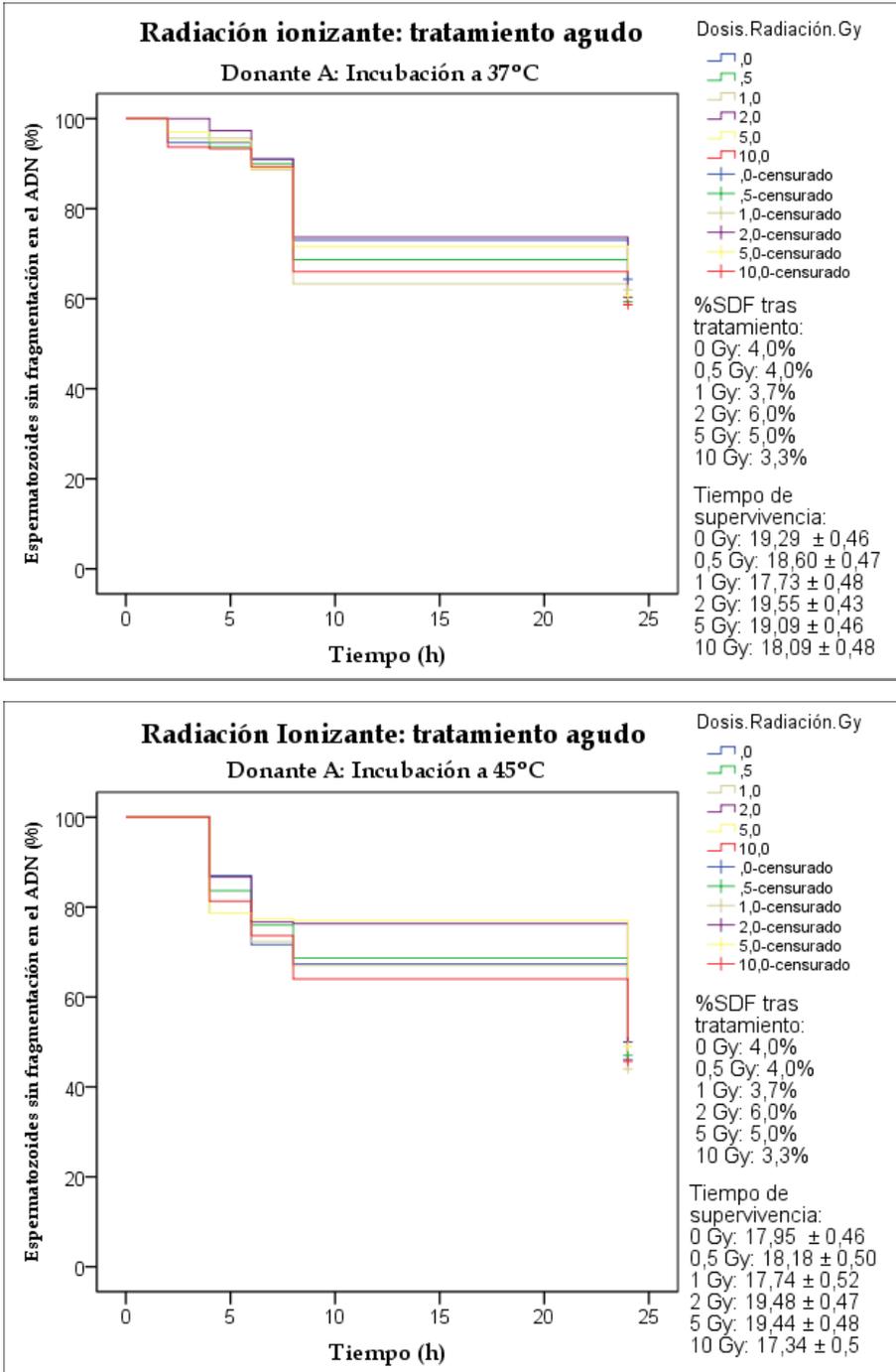


Figura 31. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante A tras la exposición a dosis crecientes de rayos-X y posterior incubación a 37°C y 45°C durante 24 h. El tiempo de supervivencia se da en media ± desviación estándar.

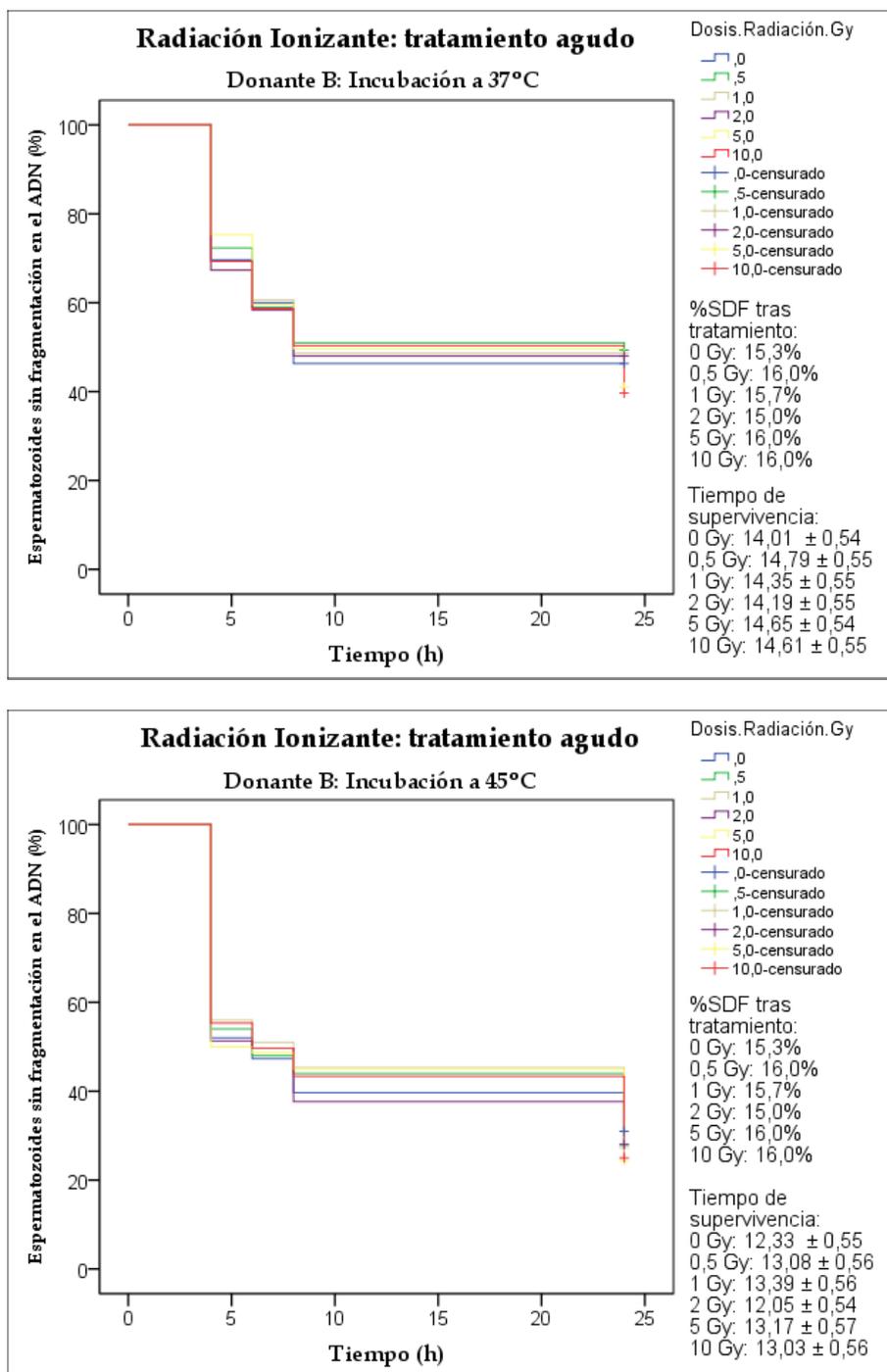


Figura 32. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante B tras la exposición a dosis crecientes de rayos-X y posterior incubación a 37°C y 45°C durante 24 h. El tiempo de supervivencia se da en media ± desviación estándar.

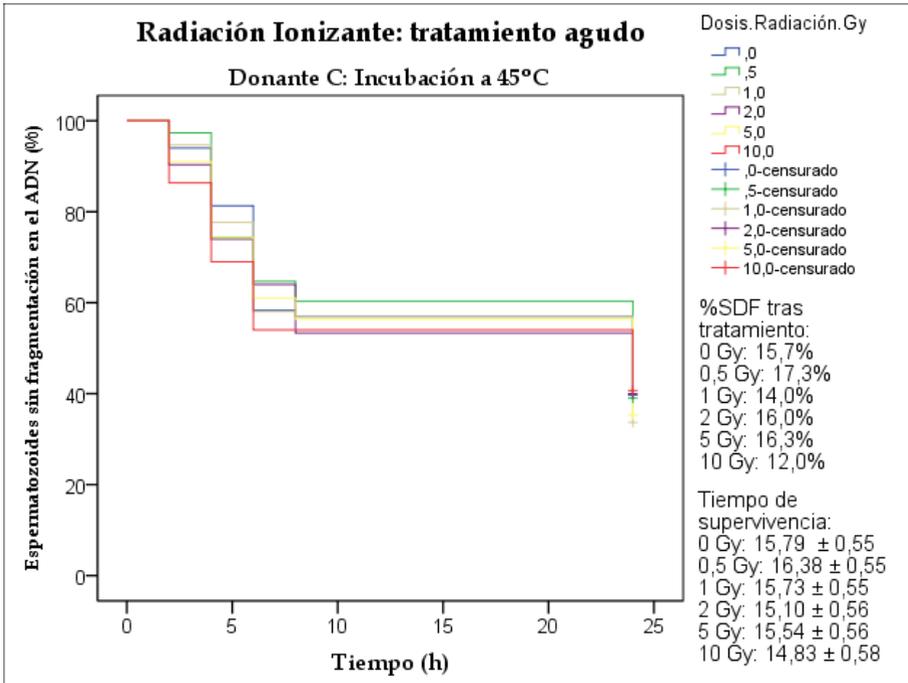
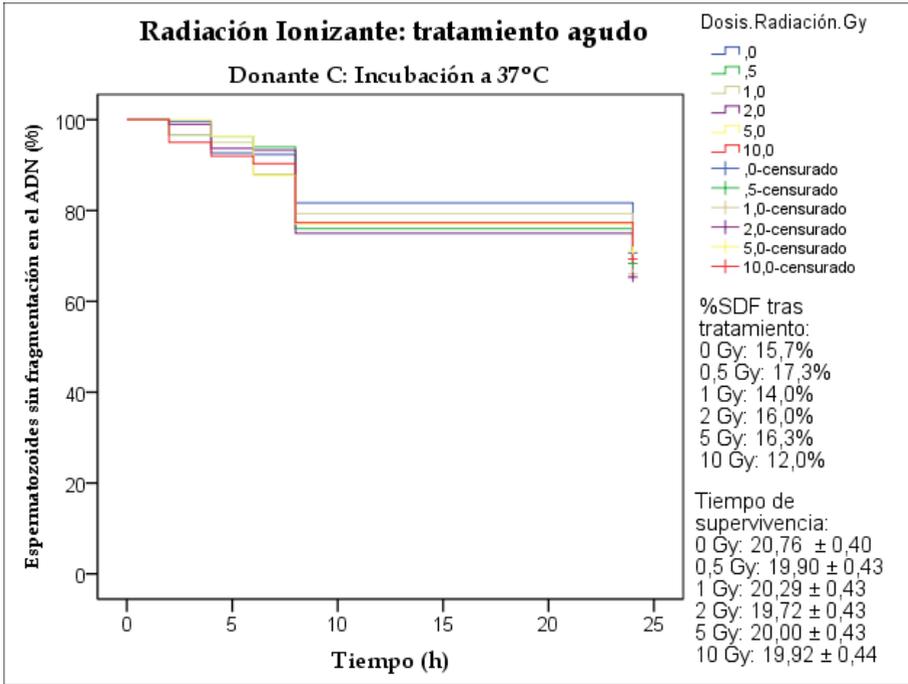


Figura 33. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante C tras la exposición a dosis crecientes de rayos-X y posterior incubación a 37°C y 45°C durante 24 h. El tiempo de supervivencia se da en media ± desviación estándar.

Efecto de la hipertermia

Dado el efecto de la alta temperatura en el experimento previo, se realizó un estudio más detallado en nuevos donantes. Para evaluar el efecto de la exposición crónica a hipertermia, se incubaron las muestras de tres donantes (D - F) a 37°C, 41°C y 45°C, durante 24h. Se observaron diferencias significativas en la tasa de SDF cuando se compararon las muestras incubadas a las diferentes temperaturas, de manera que cuanto más alta era la temperatura más rápido se fragmentaba el ADN. Esto ocurrió así en los tres donantes analizados ($p < 0,001$) (Figuras 34, 35 y 36). El tiempo medio de supervivencia, o lo que es lo mismo, el tiempo medio que aguantan los espermatozoides sin fragmentarse en cada nivel del factor, se redujo casi a la mitad tras la incubación a 41°C y a la mitad o más tras la incubación a 45°C. La afectación a 45°C fue mucho más fuerte que en los donantes del experimento anterior y, a diferencia de ellos, en este caso no se encontraron diferencias entre los individuos analizados, ni a 41°C ni a 45°C. Sólo el donante E mostró una aceleración de la dinámica, estadísticamente significativa, a 37°C.

En el caso del tratamiento agudo, durante sólo 1 h, la SDF aumentó inmediatamente tras la exposición a la hipertermia y, de manera similar a lo que ocurría en el tratamiento crónico, cuanto más alta era la temperatura de incubación, mayor era el incremento de la SDF. De hecho, tras 1 h a 45°C, el nivel de SDF fue cerca del doble del que presentaban los espermatozoides mantenidos a 37°C (Figuras 34, 35 y 36). Tras la relativización de los datos, realizada para eliminar las diferencias surgidas en el índice de SDF por la incubación de las muestras a las diferentes temperaturas, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, obtenidas tras la incubación de las muestras a 37°C durante 24 h, indicaron que la exposición aguda a alta temperatura modificaba la dinámica del proceso de degradación del ADN de aquellos espermatozoides donde no se detectó inicialmente ningún daño del ADN por el aumento transitorio de la temperatura. Esto se observó en los tres donantes estudiados (Figuras 34, 35 y 36). La tasa de SDF, tras la exposición aguda a estrés por calor, no sufrió una aceleración tan grande como en el caso de la hipertermia crónica. En el donante D, no se encontraron diferencias significativas entre las tasas de SDF a 41°C y a 45°C, aunque ambas fueron significativamente más altas que la del control a 37°C ($p < 0,001$) (Figura 34). En el donante F, cuanto más alta fue la temperatura de incubación más alta fue la tasa de SDF ($p < 0,001$) (Figura 36). En el donante E, se encontraron diferencias significativas entre las curvas de

supervivencia a 37°C y a 41°C ($p < 0,001$), pero no se observaron diferencias significativas entre 37°C y 45°C (Figura 35). Es más, el tiempo medio de supervivencia, o lo que es lo mismo, el tiempo medio que permanece un espermatozoide sin fragmentarse, fue mayor a 45°C ($17,19 \pm 0,58$ h) que a 41°C ($14,27 \pm 0,61$ h) e incluso que a 37°C ($16,01 \pm 0,55$ h). En este donante, tras la incubación durante 1 h a 45°C, la muestra alcanzó una SDF del 51,7%. Durante la primera hora de incubación a 37°C, tras eliminar el estrés térmico, la tasa de SDF de esta muestra era la más alta, comparada con las que estuvieron sometidas a 41°C y 37°C, alcanzando un 70% de SDF, pero a partir de aquí, la tasa de fragmentación se empieza a ralentizar. Esto podría ser debido a la heterogeneidad de la población espermática. De hecho, en las muestras incubadas a 37°C y 41°C se observa esta misma deceleración en la tasa de SDF cuando alcanzan porcentajes de SDF cercanos al 70%. Estos resultados sugieren que existe una subpoblación de espermatozoides, que supondrían aproximadamente un 30% de la población total, que son más resistentes a la temperatura.

En general, estos resultados indican que la exposición continua durante 24 h a hipertermia acelera la tasa de fragmentación del ADN de los espermatozoides maduros, de una manera dependiente de la temperatura. Sorprendentemente, la exposición aguda durante 1 h a hipertermia también acelera la tasa de degradación del ADN de aquellos espermatozoides que en un principio no parecían afectados por el tratamiento.

El calor es un agente físico dañino que tiene un efecto pleiotrópico. Puede alterar la estructura de ciertas proteínas sensibles al calor. Aunque es improbable que pueda inducir directamente roturas en el ADN, puede interferir con la reparación del daño en el ADN y de esta manera afectar a la estructura de la cromatina. Las membranas también pueden verse afectadas tras la hipertermia, proceso en el que posiblemente estarían involucradas ROS o RNS. Éstas podrían inducir la hidrólisis de esfingomielina y la formación de ceramida, lo cual, a su vez, activaría un grupo de quinasas (JNK/SAPK) que se relacionan con la muerte celular por apoptosis inducida por calor (Pandita *et al.* 2009; Tomita 2010). Específicamente en los testículos, la exposición a temperaturas elevadas se asocia con un incremento de las ROS, las cuales reaccionan rápidamente con sus sustratos, como lípidos, causando peroxidación lipídica, que afecta a las membranas espermáticas (Bansal & Bilaspuri 2008). El estrés oxidativo, generado por la exposición a temperaturas elevadas, y la peroxidación lipídica podrían desencadenar un mecanismo apoptótico que activaría la generación de ROS por parte de la

mitocondria y que, en último término, daría lugar a la SDF (Koppers *et al.* 2011; Aitken & Baker 2013).

El efecto de la hipertermia sobre la integridad del ADN espermático ha sido estudiado mayoritariamente *in vivo*, en animales, tras la exposición de los testículos y el epidídimo a elevadas temperaturas. El estrés térmico tiene un efecto perjudicial sobre la espermatogénesis; los espermatoцитos y las espermátidas parecen ser muy sensibles al estrés por calor, dando lugar a un aumento de la apoptosis. Como resultado del estrés por calor, la calidad del semen disminuye, incrementando la incidencia de espermatozoides inmaduros anormales y dando lugar a subfertilidad o infertilidad (Mieusset *et al.* 1987). Sin embargo, es difícil encontrar publicaciones acerca de la influencia directa que tiene el estrés por calor en la integridad del ADN, específicamente de espermatozoides maduros y especialmente en humanos. En un estudio en caballos, en los cuales se sometían los testículos a estrés por calor durante 48 h, sólo se detectó una afectación de la cromatina espermática tras 10 días de la exposición al calor, lo cual indica que la susceptibilidad de la cromatina espermática al estrés por calor depende de la fase en la que se encuentran las células germinales masculinas dentro de la espermatogénesis. En este estudio, los espermatoцитos primarios fueron las células más sensibles, mientras que el estrés térmico, aparentemente, no afectó a los espermatozoides que se encontraban en ese momento en tránsito por el epidídimo (Love & Kenney 1999). En contraste, Paul *et al.* (2008) observaron, en ratones, que el calentamiento escrotal a 40°C, durante sólo 1 h, resultó en un ligero aumento de los espermatozoides con el ADN fragmentado sólo 3 días después de la exposición; estos resultados fueron interpretados como una alteración del empaquetamiento de la cromatina de los espermatozoides que estaban atravesando la cola y el cuerpo del epidídimo, posiblemente debido a alguna alteración de la función del epidídimo. Karabinus *et al.* (1997), en toros, demostraron que la exposición del escroto a temperaturas elevadas durante 48 h afectaba al esperma tanto epididimal como testicular, lo cual se observó por un aumento del doble en el porcentaje de SDF en los tres días siguientes a la exposición y un incremento de 5 veces 12 días después. Banks *et al.* (2005) expusieron el escroto de ratones a un leve estrés térmico (42°C durante 30 min) y observaron un incremento significativo de la SDF en espermatozoides maduros del epidídimo. En un modelo similar, Pérez-Crespo *et al.* (2008) observaron también un aumento en la SDF en los espermatozoides que se encontraban en el epidídimo en el momento del estrés por calor. Los resultados de estos estudios sugieren que el daño en el ADN espermático

podría ser el resultado de un ambiente desfavorable en el epidídimo, debido a un aumento del estrés oxidativo por el incremento de la temperatura en el epidídimo.

En la única publicación encontrada hasta la fecha, acerca del efecto del estrés por calor sobre el ADN de espermatozoides humanos maduros, Mann *et al.* (2002) observan que la exposición *in vitro* a 40°C durante 4 h sólo afectaba a la integridad del ADN de una fracción de espermatozoides que se asociaban con una baja capacidad para fecundar ovocitos. Los resultados del estudio que aquí se presenta detectaron claramente un aumento significativo de la SDF inmediatamente después de 1 h de exposición al calor. Es más, el ensayo dinámico demostró que en el resto de espermatozoides, que tras la exposición al estrés térmico no presentaban el ADN fragmentado, el ADN nuclear se degradaba más rápidamente que en los espermatozoides de la muestra control, siendo la intensidad del impacto variable entre individuos. Estas observaciones indican que estos espermatozoides presentaban algún tipo de daño por calor que se expresaría tardíamente como fragmentación del ADN. Así, además del posible incremento que pueda producir la hipertermia en la SDF basal, el resto de los espermatozoides maduros podrían estar afectados en individuos cuya temperatura testicular pueda verse incrementada. Por otro lado, también es muy interesante que, en el caso del donante E, el estudio dinámico de la SDF permitió diferenciar una subpoblación de espermatozoides más resistentes al estrés por calor.

El uso del estudio dinámico de la SDF para examinar el efecto de la hipertermia en humanos tiene un amplio rango de aplicaciones. En hombres, el aumento de la temperatura testicular puede ocurrir como resultado de una exposición ocupacional, debido al estilo de vida o a causa de un trastorno clínico (Mieusset *et al.* 1987). Por ejemplo, la exposición ocupacional puede ocurrir en hombres que trabajan en ambientes con temperaturas elevadas, como panaderos y soldadores (Thonneau *et al.* 1998) y también en profesiones que impliquen estar largos períodos de tiempo en posición sedentaria, como es el caso de los conductores profesionales. La postura, el tipo de ropa utilizada o el uso de ordenadores portátiles en el regazo también pueden causar un aumento de la temperatura escrotal (Sheynkin *et al.* 2005; Mieusset *et al.* 2007). Episodios de fiebre alta o ciertos trastornos clínicos, como la criptorquidia, que consiste en el descenso incompleto de uno o ambos testículos, también pueden resultar en la exposición de los testículos a temperaturas más altas de lo normal (Sergerie *et al.* 2007; Ferguson & Agoulnik 2013).

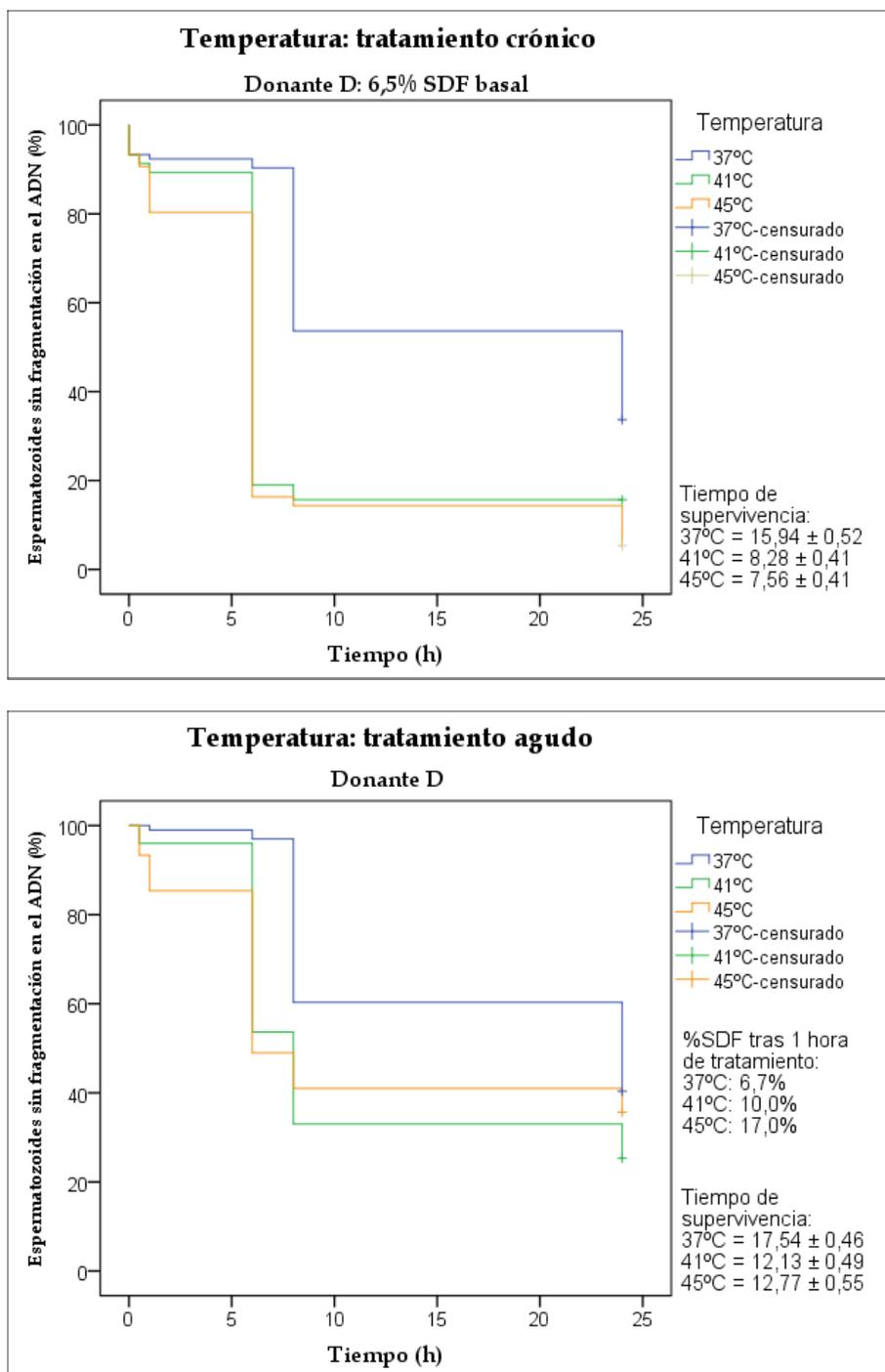


Figura 34. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante D tras la exposición a 37°C, 41°C y 45°C, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 1 h. El tiempo de supervivencia se da en media ± desviación estándar.

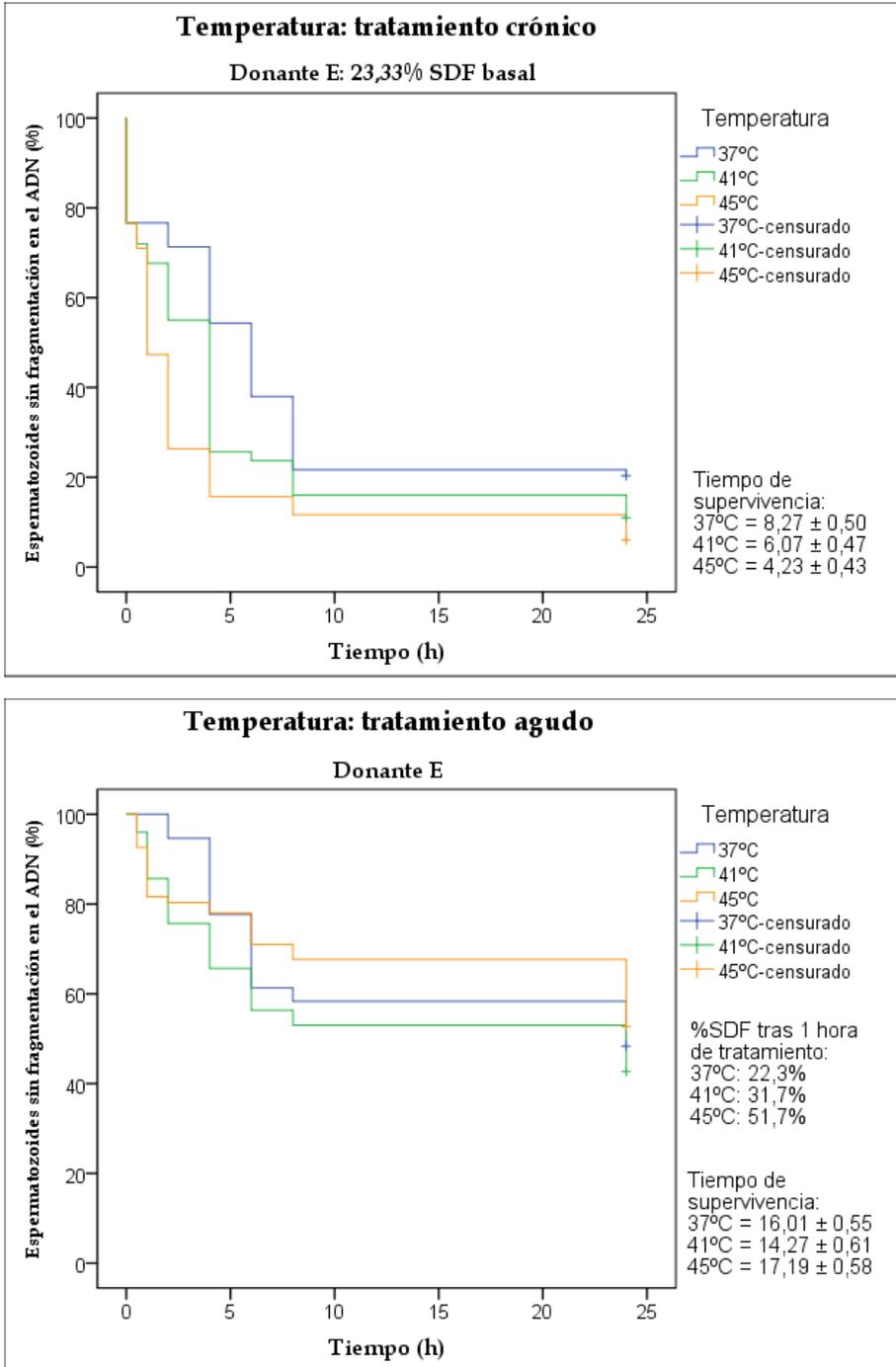


Figura 35. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante E tras la exposición a 37°C, 41°C y 45°C, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 1 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.

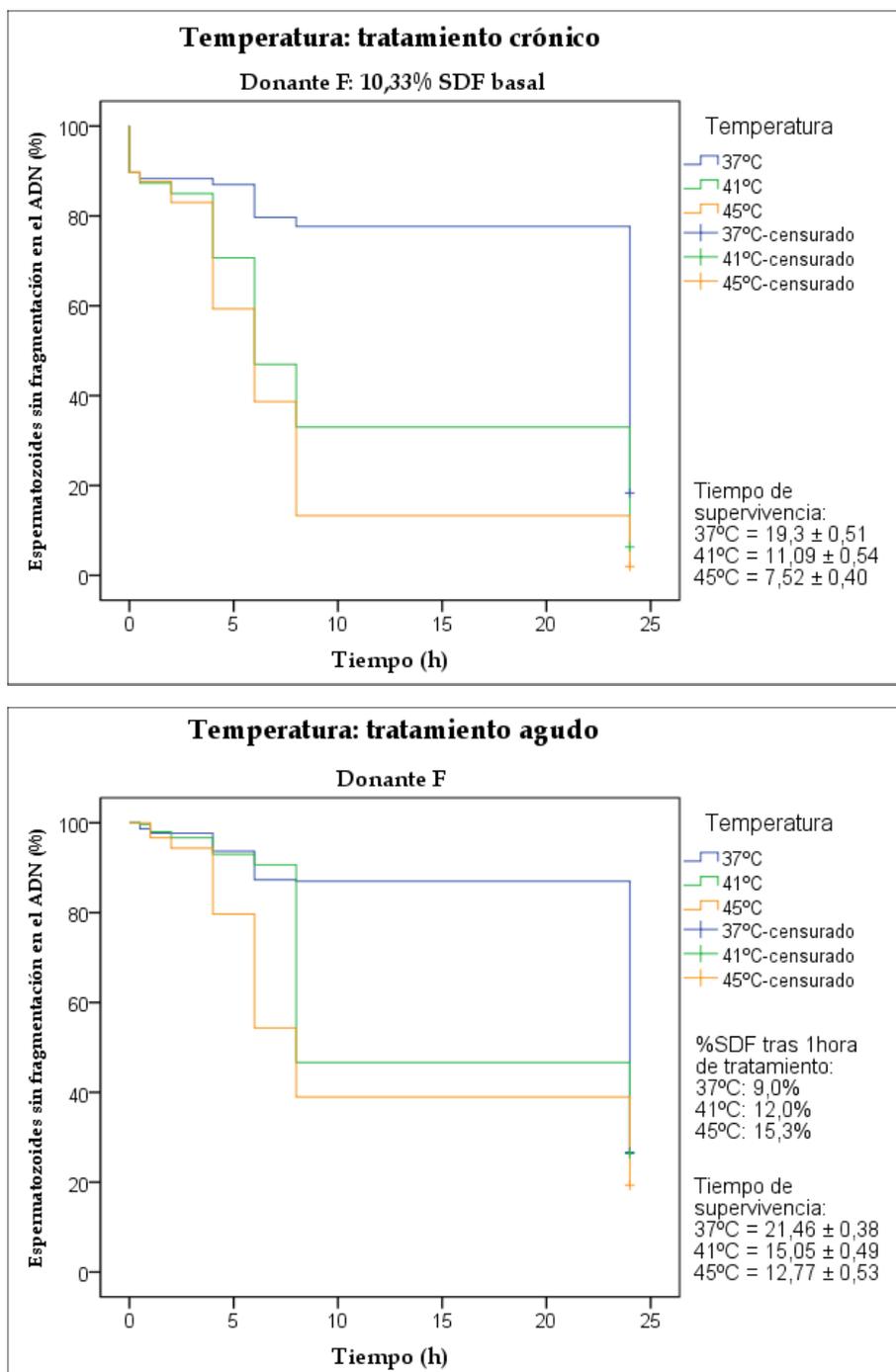


Figura 36. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante F tras la exposición a 37°C, 41°C y 45°C, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 1 h. El tiempo de supervivencia se da en media ± desviación estándar.

Efecto del pH ácido

Para evaluar el efecto del pH ácido sobre la SDF a lo largo del tiempo, se utilizaron muestras de semen de dos donantes (G y H). Cuando se compararon las muestras que habían sido expuestas a pH 4 durante 24 h con las muestras control (pH 8) se observó que la exposición continua a pH ácido aumentaba considerablemente la tasa de SDF a lo largo del tiempo, en ambos donantes ($p < 0,001$). El tiempo de supervivencia de los espermatozoides que fueron expuestos a pH 4 se redujo casi 3 veces, en el caso del donante G, y casi 4 veces, en el caso del donante H, con respecto al de las muestras control. De hecho, tras 8 h de exposición a pH 4, el 100% de la población de espermatozoides ya tenía el ADN fragmentado (Figuras 37 y 38). Cuando se compararon las curvas de supervivencia correspondientes a las muestras de semen de los dos donantes estudiados, no se observaron diferencias significativas ($p = 0,83$).

Cuando se evaluó el efecto de la exposición aguda a pH ácido, se observó que, por un lado, la exposición durante 1 h a pH 4 no aumentó de manera significativa al porcentaje de células con el ADN fragmentado, en comparación con las muestras control, en ninguno de los donantes estudiados. Sin embargo, tras eliminar el tratamiento, las curvas de supervivencia resultantes de incubar las muestras de semen a 37°C durante 24 h indicaron que este tratamiento agudo sí modificó significativamente la tasa de SDF, en los dos donantes estudiados ($p < 0,001$). Aun así, el efecto del tratamiento agudo a pH ácido no fue tan fuerte como el del tratamiento continuo (Figuras 37 y 38). Al contrario de lo que ocurría con el tratamiento crónico, en el caso del tratamiento agudo sí se observaron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los dos donantes analizados, de manera que la tasa de SDF del donante G fue significativamente mayor que la del donante H ($p < 0,001$).

La mayoría de los procesos enzimáticos están influenciados por el pH, de manera que variaciones en el pH podrían tener un importante efecto global sobre la actividad metabólica. Se ha demostrado que el medio ácido reduce el porcentaje de espermatozoides móviles y disminuye la velocidad en línea recta de los espermatozoides (Makler *et al.* 1981; Arienti *et al.* 1999). Sin embargo, hasta la fecha, no se han publicado datos acerca del efecto de variaciones de pH sobre la SDF. En este estudio, se ha demostrado que la exposición a pH ácido puede dar lugar a SDF. Aunque, inmediatamente después de la exposición transitoria de 1 h a pH ácido, no se observó un incremento de la SDF, la incubación prolongada durante 24 h reveló un

incremento significativo de la SDF. Sólo el estudio dinámico de la SDF fue capaz de detectar el efecto perjudicial de la exposición transitoria a pH ácido, demostrando, de este modo, otra vez, la eficacia del estudio dinámico de la SDF para la detección del daño latente en el ADN espermático.

Es posible que el estrés oxidativo sea el responsable del aumento de la SDF observado en este experimento. La formación de ROS y el cambio de pH intracelular son fenómenos muy comunes durante la apoptosis. De hecho, en un experimento reciente, Lemarie *et al.* (2011) han demostrado que una acidificación del pH en el interior celular da lugar a la inhibición del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, en concreto a la inhibición de la actividad succinato-ubiquinona oxidoreductasa, mientras que la actividad succinato deshidrogenasa del complejo II seguiría intacta. Sólo en esta configuración, el complejo II generaría ROS, particularmente superóxidos. Las ROS generadas por el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial podrían dar lugar de manera directa a la SDF o podrían desencadenar una respuesta apoptótica que, en último término, daría lugar a la SDF.

Desde un punto de vista práctico, es importante tener en cuenta que, tras la eyaculación en la vagina, el espermatozoide está sometido a un estrés por pH. El pH vaginal en las mujeres varía entre 3,8 y 4,5, excepto en la fase menstrual, en la cual su valor es próximo a 7 (Melis *et al.* 2000; Fernández-Cid & Fernández-Cid 2004). Estos resultados sugieren que el pH ácido vaginal podría tener un efecto perjudicial sobre la integridad del ADN espermático, incluso cuando se tratase de un contacto corto de 1 h. Aunque la SDF puede no ser aparente en un principio, la exposición transitoria a pH ácido podría provocar una aceleración en la cinética de la SDF con el tiempo en el tracto genital femenino. Es posible que el pH ácido de la vagina pueda ser importante como mecanismo de selección natural contra espermatozoides que tienen el ADN potencialmente susceptible a la fragmentación, ya que es probable que algunos de estos espermatozoides tengan el ADN fragmentado cuando alcancen el ovocito y, por lo tanto, no participarían en la fecundación de éste.

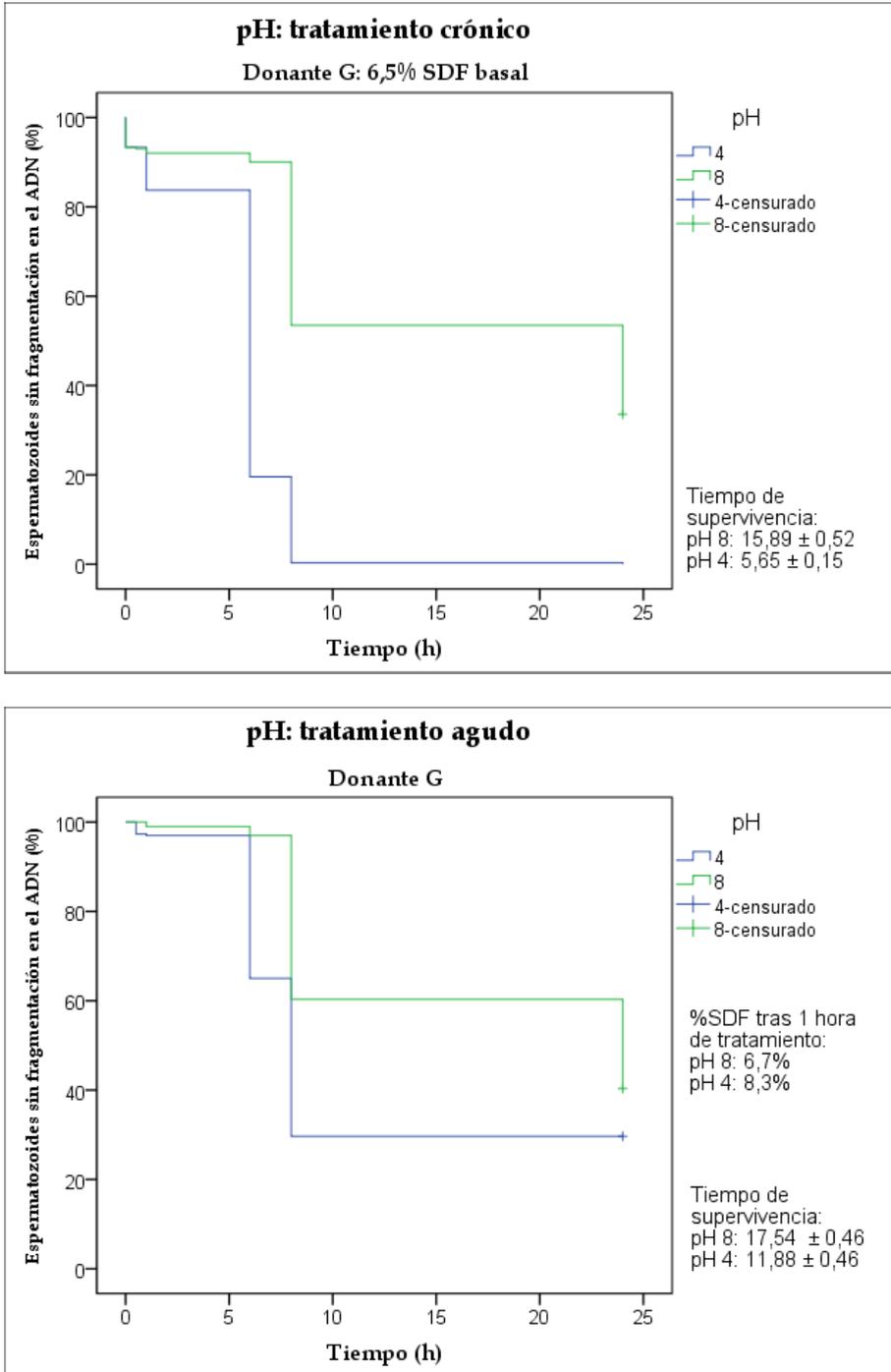


Figura 37. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante G tras la exposición a pH 8 (muestra original) y pH 4, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 1 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.

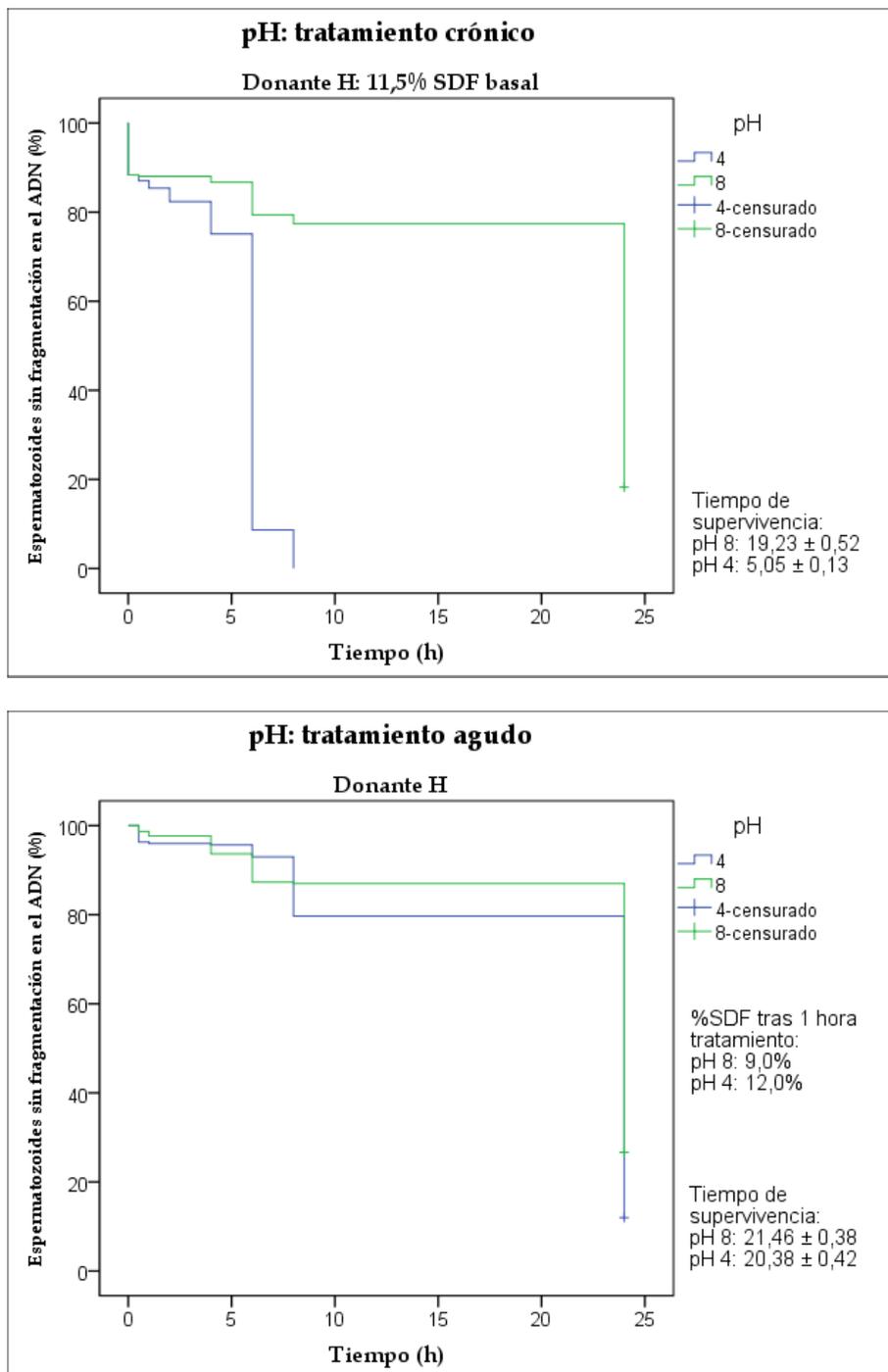


Figura 38. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante H tras la exposición a pH 8 (muestra original) y pH 4, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 1 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.

Efecto del NO•

Para evaluar el efecto de la exposición crónica a NO• sobre la SDF a lo largo del tiempo, se incubaron las muestras de tres donantes (I - K) con diferentes dosis de SNP (5, 10, 25 y 50 mM) a 37°C durante 24 h. La incubación crónica con SNP resultó en una degradación extrema del ADN espermático; la mayoría de las células se fragmentaron pocas horas después de comenzar el tratamiento, siendo la intensidad del efecto similar para las cuatro dosis en los tres donantes (Figuras 39, 40 y 41). El tiempo medio de supervivencia de los espermatozoides que fueron expuestos a SNP no superó las 2,14 h, con ninguna de las dosis estudiadas, en ninguno de los tres donantes. Tras eliminar la SDF basal, se observó que la tasa de SDF, con todas las dosis de SNP estudiadas, variaba significativamente entre los tres individuos analizados ($p < 0,001$).

El efecto de la exposición aguda de 5 min a NO• se evaluó incubando las muestras de los mismos donantes con las mismas dosis de SNP. Tras los 5 min de incubación con SNP, el porcentaje de SDF aumentó significativamente, de manera variable entre los diferentes donantes. En el caso del donante I, se observó un efecto creciente dosis-respuesta ($p < 0,001$), excepto para la dosis más alta (50 mM) (Figura 39). En el donante J, no se observaron diferencias en cuanto al efecto de las diferentes dosis (Figura 40). Por último, en el donante K, aunque no se observó claramente un efecto dosis-respuesta, sí se observó que las dosis más altas causaban más daño que las más bajas (Figura 41). Tras eliminar el porcentaje de SDF inducida inicialmente tras los 5 min de incubación con SNP, se observó que la dinámica de la SDF de las células restantes estaba claramente influenciada por el tratamiento previo con SNP, aunque menos intensamente que tras el tratamiento crónico (Figuras 39, 40 y 41). El efecto de las dosis de SNP estudiadas fue variable en cada individuo. El donante I mostró un efecto parcial dosis-respuesta (Figura 39), el donante J sólo mostró una alteración significativa tras la dosis más alta (50 mM) (Figura 40), mientras que los espermatozoides del donante K mostraron una tasa de incremento de la SDF similar en todas las dosis estudiadas (Figura 41). Al comparar las curvas de supervivencia de los diferentes donantes, no se observaron diferencias significativas entre ellos, con ninguna de las dosis de SNP, a pesar de que sí se observaron diferencias significativas en la tasa de SDF a lo largo del tiempo entre las muestras control (0 mM SNP) de los tres donantes.

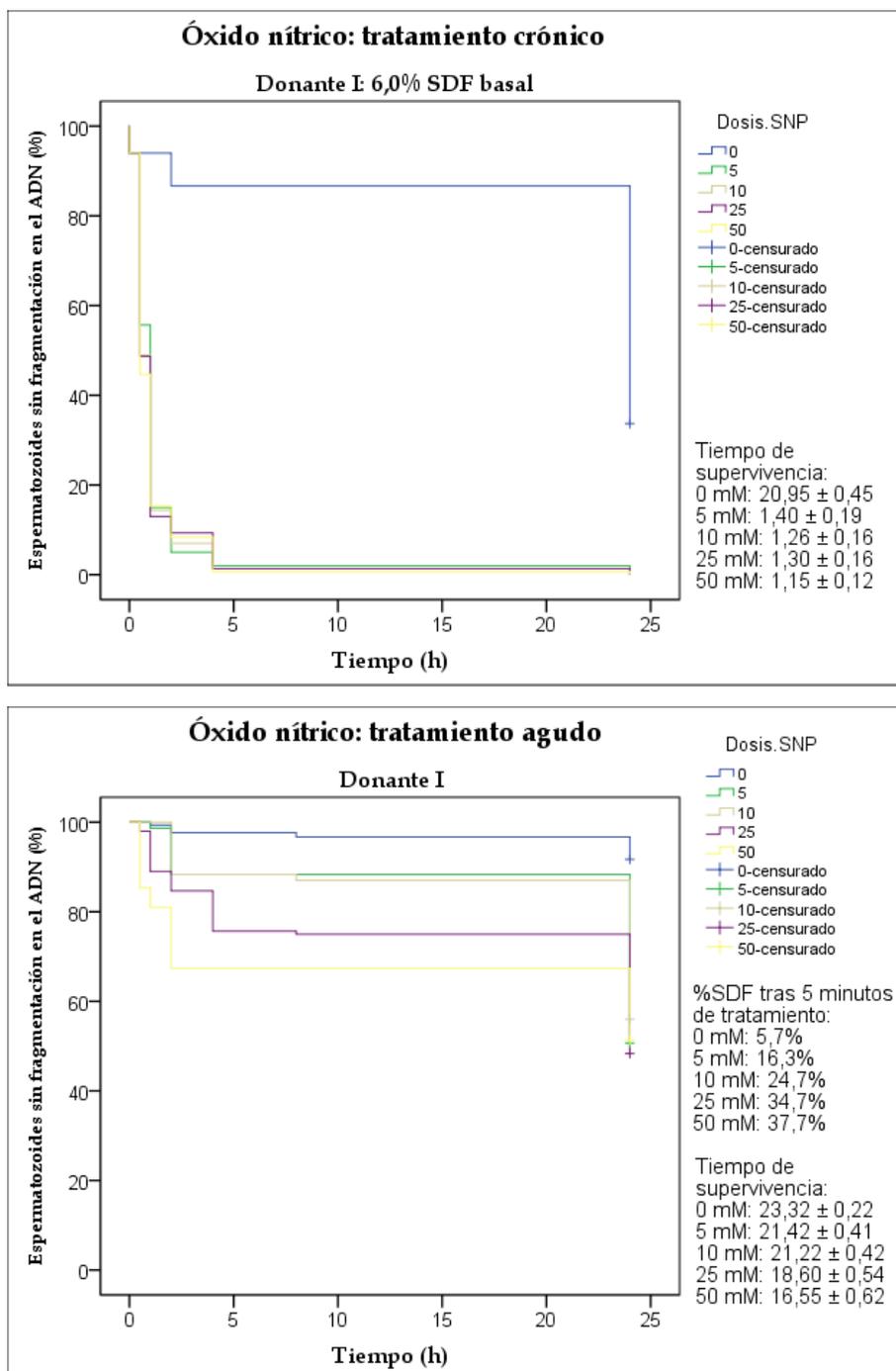


Figura 39. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante I tras la exposición a dosis crecientes de SNP, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 5 min. El tiempo de supervivencia se da en media ± desviación estándar.

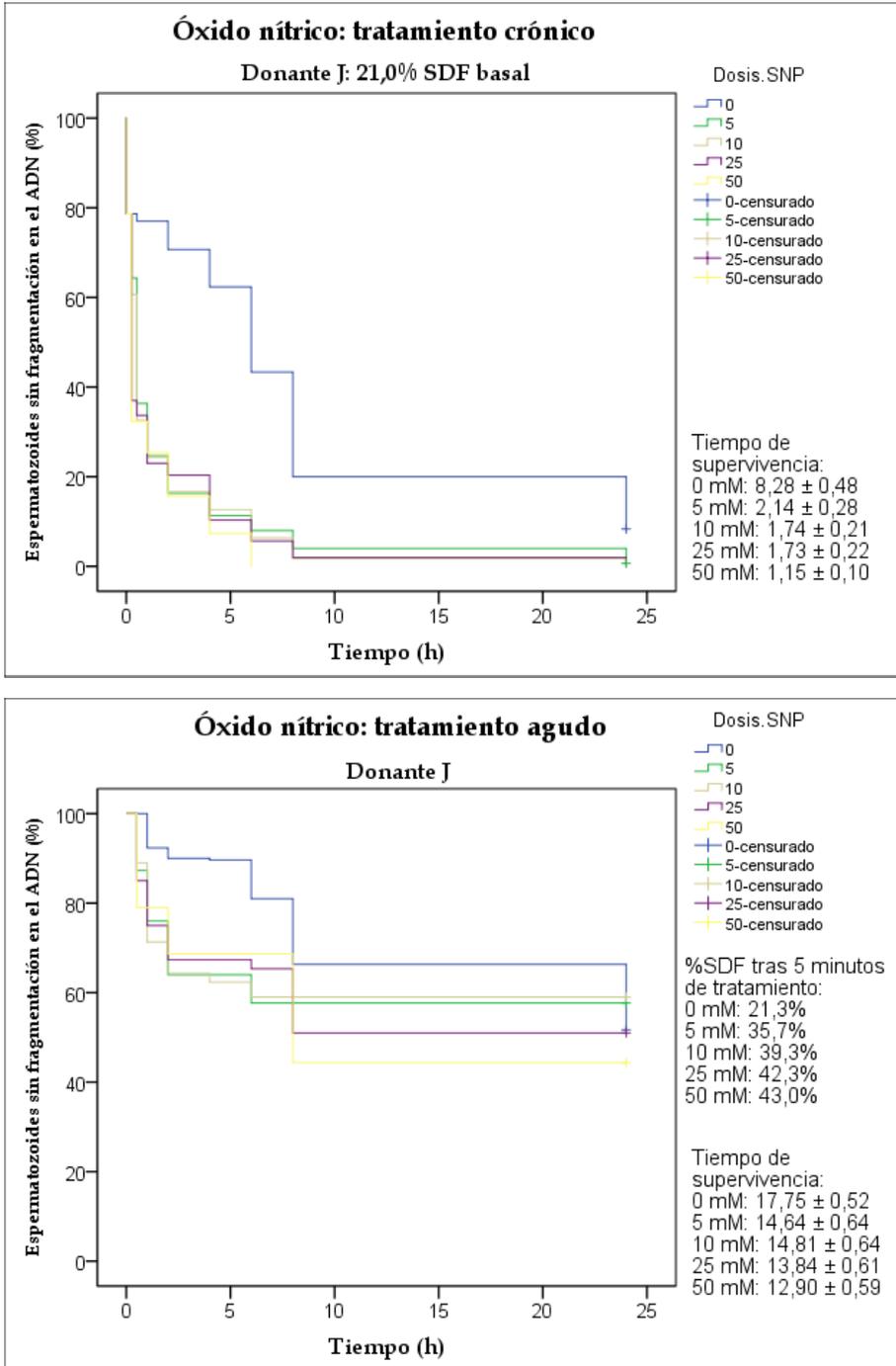


Figura 40. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante J tras la exposición a dosis crecientes de SNP, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 5 min. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.

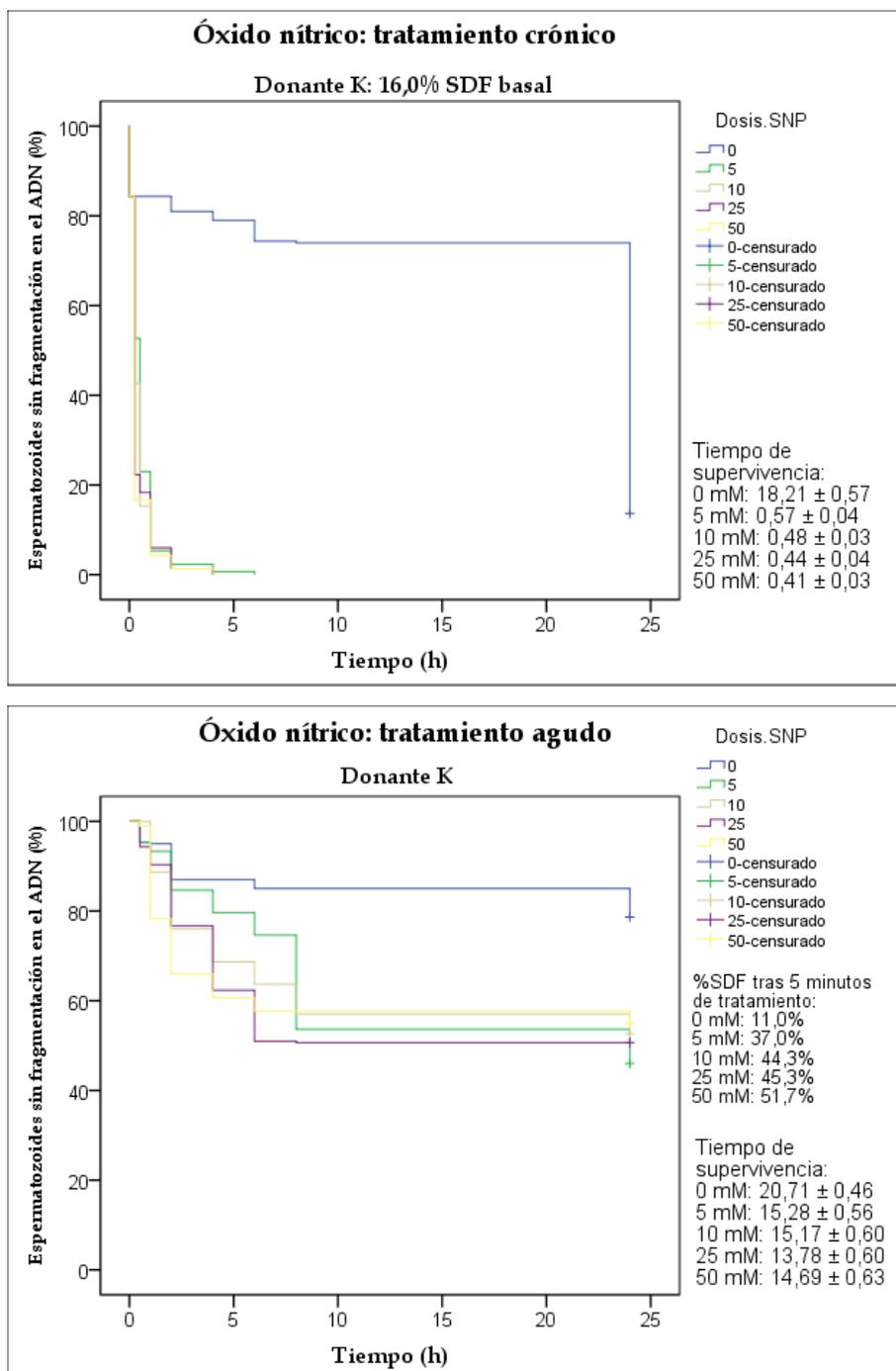


Figura 41. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante K tras la exposición a dosis crecientes de SNP, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 5 min. El tiempo de supervivencia se da en media ± desviación estándar.

La incubación de espermatozoides *in vitro* con diferentes fuentes de ROS o RNS da lugar a un incremento de la fragmentación del ADN (Aitken *et al.* 1998; Lopes *et al.* 1998; Agarwal *et al.* 2003). Los resultados obtenidos en el primer objetivo de esta tesis, tras incubarse muestras de espermatozoides con H_2O_2 y el donante de NO^\bullet , SNP, también apoyan estos resultados. En este estudio, el efecto del estrés oxidativo sobre la dinámica de la SDF se evaluó incubando los espermatozoides con SNP. Cuando se incubó SNP en sangre a 37°C , el 50% se descompone a los 26,6 min y más del 90% a las 2 h (Vesey *et al.* 1990). En este experimento, la incubación con SNP durante 24 h produjo un incremento significativo de la SDF principalmente dentro de las dos primeras horas de exposición, posiblemente debido a la descomposición de la mayoría de las moléculas de SNP. Las diferentes dosis estudiadas de SNP dieron lugar a cinéticas similares de SDF en los tres donantes, sugiriendo una saturación del efecto del SNP con el tiempo, que fue aparente incluso con la dosis más baja. Es interesante que una breve exposición, de sólo 5 min, a SNP ya produjo un incremento significativo de la SDF, independientemente de la dosis utilizada. Tras la eliminación del SNP, el resto de los espermatozoides, que inicialmente no presentaban SDF, mostraron un incremento de la tasa de SDF, cuando ésta se evaluó de manera dinámica. Al igual que en el caso de la exposición a hipertermia y a pH ácido, no todo el daño inducido por el SNP fue aparente inmediatamente.

El NO^\bullet es una pequeña molécula no polar que difunde libremente a través de las membranas, así puede actuar a relativamente larga distancia del lugar donde se produce. Es una molécula versátil que actúa fisiológicamente como mensajero celular mediando en varias funciones, incluyendo la regulación del flujo sanguíneo, trombosis, actividad neural y respuesta inmune (Moncada *et al.* 1991). Se ha demostrado que pequeñas cantidades de NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$, producidas por el propio espermatozoide, modulan funciones espermáticas, como la capacitación y la reacción acrosómica (Herrero & Gagnon 2001; Aitken & Baker 2013). El NO^\bullet , por sí solo, no reacciona con el ADN, sin embargo, en presencia de O_2 o de $\text{O}_2^{\bullet-}$ forma N_2O_3 y ONOO^- , que pueden inducir roturas en el ADN, sitios abásicos y lesiones en los residuos de guanina (Burney *et al.* 1999). El NO^\bullet , además de atacar al ADN, también puede producir daño oxidativo en proteínas y lípidos (Álvarez *et al.* 1987). El estrés oxidativo y la peroxidación lipídica podrían desencadenar una cascada apoptótica que activaría la generación de ROS por parte de la mitocondria en un ciclo redox que se perpetuaría a sí mismo (Aitken & Baker 2013). De esta manera, la SDF observada tras la incubación de los

espermatozoides con SNP podría ser una consecuencia directa del ataque del NO• sobre el ADN o de las ROS liberadas por la mitocondria en un proceso apoptótico activado como respuesta al estrés oxidativo generado por el NO•.

Muchas patologías andrológicas implican estrés oxidativo en su fisiopatología, incluyendo enfermedades infecciosas e inflamatorias. En hombres subfértiles con varicocele, se ha observado una liberación excesiva de NO• en las venas espermáticas dilatadas (Ozbek *et al.* 2000). Aunque, en estos pacientes, es evidente el aumento de la SDF basal justo después de la eyaculación, el estudio dinámico podría ser más sensible para detectar algún otro daño latente en el espermatozoide que no es evidente con un análisis estático inicial.

En general, los resultados de estos experimentos demuestran que el estudio dinámico de la SDF es una herramienta útil para la evaluación del efecto de un rango de agentes que a ciertos niveles resultan tóxicos para el ADN espermático y que pueden afectar a la reproducción. El estudio convencional de la SDF generalmente se limita a un análisis estático inicial, sin embargo, el estudio dinámico puede ser de interés en toxicología genética reproductiva para detectar, no sólo el daño inmediato causado por un determinado tóxico en el ADN espermático, sino también un daño latente que sólo se exprese de manera tardía, lo cual podría darse, particularmente, en casos de exposiciones transitorias o temporales al tóxico o si los efectos del agente tóxico son leves. Mientras que las diferentes dosis de rayos X utilizadas en este experimento fueron incapaces de inducir SDF, se observó un claro efecto tras la hipertermia, la exposición a pH ácido y a NO•, pero lo más interesante fue que, tras eliminar estos agentes, se observó que la longevidad del ADN de los espermatozoides, que, en un principio, aparentemente, no fueron dañados, estaba afectada y esto podría ser consecuencia de un proceso apoptótico que podría ser activado por estrés oxidativo. Si el estudio dinámico de la SDF es utilizado como modelo para evaluar el daño en el ADN espermático, la extensión y la incidencia real del daño en el ADN de pacientes asociados con episodios de fiebre, calor local, inflamación, infección y varicocele podría ser mucho más alta que la previamente publicada. Por otro lado, estos experimentos también ponen de manifiesto la importancia del momento de determinación de la SDF tras la eyaculación, ya que dependiendo del momento en el que se analice la muestra, tras la inducción del daño en el ADN, el valor de la SDF puede ser diferente. La identificación en un paciente de una dinámica de la SDF anormalmente

acelerada podría indicar un daño latente en el ADN espermático y podría ser completamente independiente del nivel de SDF basal obtenido tras la eyaculación.

Valoración final

Con los trabajos que componen esta tesis, hemos intentado arrojar un poco de luz a las principales cuestiones que rodean al estudio de la SDF y que todavía están sin resolver.

Con respecto al origen de la SDF, los resultados obtenidos tras estudiar la relación entre la fragmentación y la presencia de 8-oxoG en el ADN espermático (primer objetivo de esta tesis) indican una relación directa entre ambos tipos de daño. Nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que, aunque no habían estudiado estos dos tipos de daño de manera simultánea en la misma célula, sí habían observado una fuerte correlación entre el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado y el porcentaje de espermatozoides con daño oxidativo, e indican que el daño oxidativo podría ser el mayor contribuyente al daño en el ADN observado en la línea germinal masculina.

Los resultados obtenidos tras estudiar la relación entre la fragmentación del ADN y la longitud media de la secuencia telomérica en espermatozoides (tercer objetivo de esta tesis) apoyan esta afirmación. Otros autores habían demostrado que, por la posición que ocupan en la periferia del núcleo y por el hecho de estar unidos a histonas, los telómeros son más vulnerables al daño oxidativo que el resto del ADN espermático, y que este daño oxidativo puede producir un acortamiento de los mismos. Aunque no hemos podido demostrar que exista una relación de manera directa entre la SDF y la longitud del telómero, es decir, que aquellos espermatozoides que presentan SDF tienen los telómeros más cortos, sí hemos observado que la fracción de espermatozoides con alta movilidad, seleccionada por *swim-up*, tiene telómeros más largos y menos SDF que la población total de espermatozoides.

Aunque cada vez hay más evidencias de que el daño oxidativo podría ser el principal causante de la SDF observada en espermatozoides, todavía no está claro si el daño oxidativo da lugar a la SDF de manera directa o de manera indirecta a través de un mecanismo apoptótico. A este respecto, son interesantes los resultados obtenidos al estudiar la matriz proteica nuclear en espermatozoides con el ADN fragmentado (segundo objetivo de esta tesis), en los que observamos que, tras eliminar las histonas, los leucocitos apoptóticos mantienen una matriz nuclear residual muy similar a la que presentan los espermatozoides con el ADN fragmentado tras eliminar las

protaminas. Algo que no ocurre en leucocitos normales (no apoptóticos) ni en espermatozoides que no tienen el ADN fragmentado y que sugiere que las modificaciones observadas en la matriz de los espermatozoides con el ADN fragmentado podrían ser similares a las que acompañan a la degradación apoptótica del ADN en células somáticas.

Con respecto a las causas que podrían dar lugar a SDF, en el cuarto y quinto objetivo de esta tesis, analizamos la relación entre el cáncer o la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* con la SDF, dos de las causas que se han relacionado con un descenso en la fertilidad masculina. En estos trabajos, hemos observado que el cáncer, independientemente de su origen, y la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* producen un aumento en la frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado y este aumento en la SDF podría contribuir a la infertilidad observada en estos dos grupos de pacientes. Además, en el caso de la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, el hecho de que la SDF sea el parámetro seminal que sufre una mayor mejoría tras la terapia, nos indica que el estudio de la SDF podría ser muy útil para realizar el seguimiento de la enfermedad y controlar la eficacia de la terapia en estos pacientes.

Con respecto a las consecuencias de la SDF en reproducción asistida, los resultados obtenidos al tratar de cuantificar el efecto de la SDF sobre la probabilidad de conseguir un embarazo mediante FIV o ICSI (sexto objetivo de esta tesis) demuestran que, aunque la SDF afecta negativamente a la probabilidad de obtener un embarazo, el ovocito juega un papel esencial en el destino final del embrión, de manera que un ovocito de buena calidad podría superar el impacto negativo de la fragmentación del ADN sobre la probabilidad de obtener un embarazo.

Por otro lado, el estudio dinámico de la SDF (séptimo objetivo de esta tesis) pone de manifiesto la importancia de reducir al máximo el tiempo de manejo de las muestras de semen en reproducción asistida, sobre todo en aquellos pacientes que podrían presentar una dinámica de la SDF anormalmente acelerada, como pacientes asociados con episodios de fiebre, calor local, inflamaciones, infecciones y varicocele, ya que el nivel de fragmentación en el momento de la fecundación podría ser mucho más alto que el detectado en el momento de la eyaculación. Así, la capacidad del óvulo para reparar el ADN espermático tras la fecundación y la dinámica de la SDF podrían ser algunos de los factores responsables de las diferencias observadas en las publicaciones que tratan de correlacionar la integridad del

ADN espermático con el embarazo y de la dificultad a la hora de establecer un umbral de daño para predecir fertilidad.

Con respecto a las técnicas para el estudio de la SDF, en los trabajos que componen esta tesis hemos utilizado el test SCD y hemos observado que no sólo es una técnica sencilla, reproducible y más económica que otras que se ofertan en el mercado, sino que su versatilidad permite hacer ciertos estudios que con otras técnicas sería imposible, como el estudio combinado de la SDF con el daño oxidativo o con la matriz proteica nuclear.

Conclusiones



De los resultados analizados en los trabajos que componen esta tesis, podemos obtener las siguientes conclusiones:

Objetivo 1:

Estudio de la relación entre la fragmentación y la presencia de 8-oxoG en el ADN de espermatozoides humanos.

- El estudio simultáneo, en la misma célula espermática, de la fragmentación del ADN y el daño oxidativo, en forma de 8-oxoG, demostró que el marcaje de 8-oxoG se limita, prácticamente, a los espermatozoides con el ADN fragmentado. Esto sugiere que la presencia de 8-oxoG en las bases del ADN no sería la responsable del “efecto iceberg” y que el daño oxidativo podría ser el mayor contribuyente al daño observado en la línea germinal masculina.

Objetivo 2:

Estudio de la matriz nuclear en células espermáticas con el ADN fragmentado.

- La fragmentación del ADN espermático se asocia con algún tipo de modificación en las proteínas de la matriz nuclear, la cual se muestra más compacta y resistente a la extracción mediante soluciones de lisis.
- La modificación observada en la matriz nuclear de los espermatozoides con el ADN fragmentado podría ser similar a la que acompaña al proceso de apoptosis en células somáticas.

Objetivo 3:

Evaluación de la longitud media de la secuencia de ADN telomérico y su relación con la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos.

- Los espermatozoides con alta movilidad, seleccionados mediante la técnica de *swim-up*, corresponden a una población con mayor longitud relativa del telómero y menor frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado.

Objetivo 4:

Estudio del efecto del cáncer sobre la fragmentación del ADN espermático.

- El estudio de la fragmentación del ADN en un grupo de pacientes con diferentes tipos de cáncer indica que estos presentan mayor daño en el ADN de sus espermatozoides que los donantes fértiles y que este nivel de daño es comparable al que presentan los pacientes infértiles. Esto indica que la presencia del cáncer, independientemente de su origen, afecta a la calidad espermática y sugiere que la fragmentación del ADN espermático podría ser una causa de infertilidad temporal en estos pacientes.

Objetivo 5:

Estudio del efecto de la infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* sobre la fragmentación del ADN espermático.

- Los pacientes con infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* presentan una frecuencia de espermatozoides con el ADN fragmentado 3,2 veces mayor que el grupo de controles fértiles, siendo la fragmentación del ADN espermático el parámetro seminal más afectado.
- Tras la terapia con antibióticos y antiinflamatorios, el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado disminuye significativamente, lo cual indica que el estudio de la fragmentación del ADN espermático en este tipo de pacientes podría ser muy útil para controlar la efectividad de la terapia.

Objetivo 6:***Cuantificación del efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre el resultado en reproducción asistida.***

- En mujeres con ovocitos de mala calidad, la fragmentación del ADN espermático disminuye la probabilidad de obtener un embarazo por FIV o ICSI, de manera que por cada 10% de aumento en la fragmentación del ADN espermático la probabilidad de no conseguir embarazo se multiplica por 1,31 (aumenta un 31%). Sin embargo, en mujeres con ovocitos de buena calidad, la fragmentación del ADN espermático no tiene significación clínica, lo cual indica que la calidad del ovocito condiciona el efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre la probabilidad de conseguir un embarazo y sugiere que un ovocito de buena calidad podría superar el impacto negativo de la fragmentación del ADN espermático.

Objetivo 7:***Evaluación de la dinámica de la fragmentación del ADN espermático como indicador en toxicología reproductiva.***

- La exposición aguda de muestras espermáticas a temperatura elevada, pH ácido y óxido nítrico demostró que, tras eliminar estos agentes, la longevidad del ADN de los espermatozoides que, en un principio, no aparentaban haber sido dañados, estaba afectada y esto podría ser consecuencia de un mecanismo apoptótico que podría ser activado por estrés oxidativo.
- El estudio dinámico de la fragmentación del ADN espermático es una herramienta útil para el estudio de agentes tóxicos que podrían afectar a la reproducción, que permite detectar, no sólo el daño causado de manera inmediata, sino también el daño latente que se expresa de manera tardía.

Bibliografía



- Agarwal A, Said TM (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9: 331-345.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79: 829-843.
- Agarwal A, Allamaneni SS (2005) Disruption of spermatogenesis by the cancer disease process. *J Natl Cancer Inst Monogr*,34: 9-12.
- Agarwal A, Singh A, Hamada A, Kesari K (2011) Cell phones and male infertility: a review of recent innovations in technology and consequences. *Int Braz J Urol* 37: 432-454.
- Ahmadi A, Ng SC (1999) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 284: 696-704.
- Ahnstrom G, Erixon K (1973) Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 23: 285-289.
- Aitken RJ, Clarkson JS (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81: 459-469.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989a) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 41: 183-197.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC (1989b) Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl* 10: 214-220.
- Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC (1991) Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 164: 542-551.
- Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW (1992) Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil* 94: 451-462.
- Aitken RJ, West K, Buckingham D (1994) Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 15: 343-352.

- Aitken RJ, Baker HW (1995) Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod* 10: 1736-1739.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59: 1037-1046.
- Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI (2009) Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32: 46-56.
- Aitken RJ, De Iuliis GN (2010) On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 16: 3-13.
- Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI (2010) Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 25: 2415-2426.
- Aitken RJ, Curry BJ (2011) Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal* 14: 367-381.
- Aitken RJ, Koppers AJ (2011) Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 13: 36-42.
- Aitken RJ, Baker MA (2013) Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol* 57: 265-272.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J (1994) Células germinales y fecundación. In: *Biología molecular de la célula*, 2nd edn; Chap. 15, pp. 895-936. Barcelona: Omega, S. A.
- Álvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8: 338-348.
- Álvarez JG (2005) The predictive value of sperm chromatin structure assay. *Hum Reprod* 20: 2365-2367.
- Allen NC, Herbert CM, Maxson WS, Rogers BJ, Diamond MP, Wentz AC (1985) Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil Steril* 44: 569-580.

- Andrade-Rocha FT (2003) Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. *Urol Int* 71: 377-381.
- Aoki VW, Liu L, Carrell DT (2005a) Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 20: 1298-1306.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT (2005b) DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 26: 741-748.
- Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT (2006a) Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 27: 890-898.
- Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, Carrell DT (2006b) Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril* 86: 1408-1415.
- Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP (1997) Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res* 236: 231-237.
- Arienti G, Carlini E, Nicolucci A, Cosmi EV, Santi F, Palmerini CA (1999) The motility of human spermatozoa as influenced by prostasomes at various pH levels. *Biol Cell* 91: 51-54.
- Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, Platts AE, Saida M, Steger K, Tedder P, Miller D (2009) Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* 19: 1338-1349.
- Avendaño C, Mata A, Sánchez Sarmiento CA, Doncel GF (2012) Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 97: 39-45.
- Bailey SM, Murnane JP (2006) Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res* 34: 2408-2417.

- Baird DM, Britt-Compton B, Rowson J, Amso NN, Gregory L, Kipling D (2006) Telomere instability in the male germline. *Hum Mol Genet* 15: 45-51.
- Bakos HW, Thompson JG, Feil D, Lane M (2008) Sperm DNA damage is associated with assisted reproductive technology pregnancy. *Int J Androl* 31: 518-526.
- Balhorn R (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 93: 298-305.
- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Watkins B (1991) Identification of bull protamine disulfides. *Biochemistry* 30: 175-181.
- Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT (2005) Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 129: 505-514.
- Bansal AK, Bilaspuri GS (2008) Oxidative stress alters membrane sulfhydryl status, lipid and phospholipid contents of crossbred cattle bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 104: 398-404.
- Barone JG, De Lara J, Cummings KB, Ward WS (1994) DNA organization in human spermatozoa. *J Androl* 15: 139-144.
- Barone JG, Christiano AP, Ward WS (2000) DNA organization in patients with a history of cryptorchidism. *Urology* 56: 1068-1070.
- Barroso G, Morshedi M, Oehninger S (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15: 1338-1344.
- Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J (2007) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 87: 93-100.
- Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ (2007) Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril* 87: 1087-1097.
- Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D (1993) Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 49: 1083-1088.

- Blackhall FH, Atkinson AD, Maaya MB, Ryder WD, Horne G, Brison DR, Lieberman BA, Radford JA (2002) Semen cryopreservation, utilisation and reproductive outcome in men treated for Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 87: 381-384.
- Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, Christensen P (2006) The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 21: 1576-1582.
- Boissonneault G (2002) Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett* 514: 111-114.
- Borges HL, Linden R, Wang JY (2008) DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system. *Cell Res* 18: 17-26.
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G (2006) Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 21: 2876-2881.
- Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S (2008) A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle* 7: 3499-3502.
- Breen AP, Murphy JA (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18: 1033-1077.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A (2004) The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 19: 1401-1408.
- Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A (2007) Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 22: 174-179.
- Bungum M, Bungum L, Lynch KF, Wedlund L, Humaidan P, Giwercman A (2012) Spermatozoa DNA damage measured by sperm chromatin structure assay (SCSA) and birth characteristics in children conceived by IVF and ICSI. *Int J Androl* 35: 485-490.
- Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1999) The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxyxynitrite. *Mutat Res* 424: 37-49.

- Campbell AJ, Irvine DS (2000) Male infertility and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Br Med Bull* 56: 616-629.
- Carrell DT, Liu L (2001) Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 22: 604-610.
- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 13: 313-327.
- Casasnovas RO, Mounier N, Brice P, Divine M, Morschhauser F, Gabarre J, Blay JY, Voillat L, Lederlin P, Stamatoullas A, Bienvenu J, Guiguet M, Intrator L, Grandjean M, Briere J, Ferme C, Salles G (2007) Plasma cytokine and soluble receptor signature predicts outcome of patients with classical Hodgkin's lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 25: 1732-1740.
- Caulfield JL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1998) Nitric oxide-induced deamination of cytosine and guanine in deoxynucleosides and oligonucleotides. *J Biol Chem* 273: 12689-12695.
- Cawthon RM (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e47.
- Cengiz T, Aydoganli L, Baykam M, Mungan NA, Tuncbilek E, Dincer M, Yakupoglu K, Akalin Z (1997) Chlamydial infections and male infertility. *Int Urol Nephrol* 29: 687-693.
- Cobb J, Reddy RK, Park C, Handel MA (1997) Analysis of expression and function of topoisomerase I and II during meiosis in male mice. *Mol Reprod Dev* 46: 489-498.
- Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN (2008) Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 89: 823-831.
- Cook PR, Brazell IA (1975) Supercoils in human DNA. *J Cell Sci* 19: 261-279.
- Cordelli E, Fresegna AM, Leter G, Eleuteri P, Spano M, Villani P (2003) Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation. *Radiat Res* 160: 443-451.

- Crane DD, Carlson JH, Fischer ER, Bavoil P, Hsia RC, Tan C, Kuo CC, Caldwell HD (2006) Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1894-1899.
- Cunningham KA, Beagley KW (2008) Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. *Biol Reprod* 79: 180-189.
- Chen JL, Longo FJ (1996) Expression and localization of DNA topoisomerase II during rat spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 45: 61-71.
- Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 28: 82-86.
- Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM (2003) Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 69: 211-217.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 27: 53-59.
- D'Agata R, Vicari E, Moncada ML, Sidoti G, Calogero AE, Fornito MC, Minacapilli G, Mongioi A, Polosa P (1990) Generation of reactive oxygen species in subgroups of infertile men. *Int J Androl* 13: 344-351.
- D'Ambrosio SM, Gibson-D'Ambrosio RE, Brady T, Oberyszyn AS, Robertson FM (2001) Mechanisms of nitric oxide-induced cytotoxicity in normal human hepatocytes. *Environ Mol Mutagen* 37: 46-54.
- Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 369: 131-135.
- de Barbeyrac B, Papaxanthos-Roche A, Mathieu C, Germain C, Brun JL, Gachet M, Mayer G, Bebear C, Chene G, Hocke C (2006) Chlamydia trachomatis in subfertile couples undergoing an in vitro fertilization program: a prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 129: 46-53.
- De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ (2009) DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 81: 517-524.

- de Lamirande E, Gagnon C (1995) Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 10: 15-21.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2: 48-54.
- de Lange T (1992) Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *EMBO J* 11: 717-724.
- de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM (2003) Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 68: 2122-2134.
- Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Ballescà JL, Oliva R (2007) Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A* 71: 1011-1018.
- Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S (2002) Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 17: 3122-3128.
- Edelstein A, Yavetz H, Kleiman SE, Botchan A, Hauser R, Paz G, Yogev L (2008) Deoxyribonucleic acid-damaged sperm in cryopreserved-thawed specimens from cancer patients and healthy men. *Fertil Steril* 90: 205-208.
- Eirín-López JM, Frehlick LJ, Ausió J (2006) Protamines, in the footsteps of linker histone evolution. *J Biol Chem* 281: 1-4.
- Eley A, Hosseinzadeh S, Hakimi H, Geary I, Pacey AA (2005a) Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Hum Reprod* 20: 2601-2607.
- Eley A, Pacey AA, Galdiero M, Galdiero F (2005b) Can *Chlamydia trachomatis* directly damage your sperm? *Lancet Infect Dis* 5: 53-57.
- Emery BR, Carrell DT (2006) The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryogenesis. *Asian J Androl* 8: 131-142.
- Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejo JM, Ardoy M, Pacheco A, Gosálvez J (2006) Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl* 27: 106-111.

- Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL, Gosálvez J (2009) A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 18: 609-616.
- Erenpreisa J, Erenpreiss J, Freivalds T, Slaidina M, Krampe R, Butikova J, Ivanov A, Pjanova D (2003) Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry A* 52: 19-27.
- Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M (2004) Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod* 19: 2277-2282.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210: 1131-1133.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14: 1039-1049.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 23: 25-43.
- Evenson DP, Wixon R (2005) Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 532-537.
- Evenson DP, Wixon R (2006a) Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 12: 466-472.
- Evenson DP, Wixon R (2006b) Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 65: 979-991.
- Fait G, Yogev L, Botchan A, Paz G, Lessing JB, Yavetz H (2001) Sex chromosome aneuploidy in sperm cells obtained from Hodgkin's lymphoma patients before therapy. *Fertil Steril* 75: 828-829.
- Feng HL (2003) Molecular biology of male infertility. *Arch Androl* 49: 19-27.
- Ferguson L, Agoulnik AI (2013) Testicular cancer and cryptorchidism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 32.

- Fernández-Cid A, Fernández-Cid M (2004) El pH vaginal y su importancia clínica. *Ginecol Obstet Clin* 5: 75-80.
- Fernández-González R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramírez MA, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Álvarez P, de Dios Hourcade J, de Fonseca FR, Gutiérrez-Adán A (2008) Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 78: 761-772.
- Fernández JL, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, Gosálvez J (1998) Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet* 82: 251-256.
- Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, de la Torre J, Gosálvez J (2000) DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res* 453: 77-82.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Álvarez JG (2003) The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24: 59-66.
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C (2005a) Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 84: 860.
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C (2005b) Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 84: 833-842.
- Fernández JL, Vélez de la Calle JF, Tamayo M, Cajigal D, Agarwal A, Gosálvez J (2009) Sperm DNA integrity and male infertility: current perspectives. *Arch Med Sci* 5: 55-62.
- Filatov MV, Semenova EV, Vorob'eva OA, Leont'eva OA, Drobchenko EA (1999) Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Mol Hum Reprod* 5: 825-830.
- Fowlkes DM, MacLeod J, O'Leary WM (1975) T-mycoplasmas and human infertility: correlation of infection with alterations in seminal parameters. *Fertil Steril* 26: 1212-1218.

- Frydman N, Prisant N, Hesters L, Frydman R, Tachdjian G, Cohen-Bacrie P, Fanchin R (2008) Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 89: 92-97.
- Galdiero F, Sommese L, Gorga F, Galdiero E, Rizzo A, Ajello M (1994) Toxic effect on human spermatozoa by Chlamydia trachomatis purified lipopolysaccharide. *FEMS Microbiol Lett* 115: 197-200.
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15: 830-839.
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spano M (2004) Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 19: 1409-1417.
- García-Contreras A, De Loera Y, García-Artiga C, Palomo A, Guevara JA, Herrera-Haro J, López-Fernández C, Johnston S, Gosálvez J (2011) Elevated dietary intake of Zn-methionate is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar. *Reprod Toxicol* 31: 570-573.
- Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussoar F, Rousseaux S, Khochbin S (2010) From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* 277: 599-604.
- Gawecka JE, Marh J, Ortega M, Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS (2013) Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. *PLoS One* 8: e56385.
- Gdoura R, Keskes-Ammar L, Bouzid F, Eb F, Hammami A, Orfila J (2001) Chlamydia trachomatis and male infertility in Tunisia. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 6: 102-107.
- Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, Chakroun N, Sellemi A, Znazen A, Rebai T, Hammami A (2008) Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl* 29: 198-206.
- Gharagozloo P, Aitken RJ (2011) The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 26: 1628-1640.

- Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Zalensky AO (2000) Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol* 151: 1591-1598.
- Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, Rylander L (2010) Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 33: e221-227.
- Gnarpe H, Friberg J (1972) Mycoplasma and human reproductive failure. I. The occurrence of different Mycoplasmas in couples with reproductive failure. *Am J Obstet Gynecol* 114: 727-731.
- Gnarpe H, Friberg J (1973) T mycoplasmas on spermatozoa and infertility. *Nature* 245: 97-98.
- Gómez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ (1996) Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 17: 276-287.
- Gonzales GF, Muñoz G, Sánchez R, Henkel R, Gallegos-Ávila G, Díaz-Gutiérrez O, Vigil P, Vásquez F, Kortebani G, Mazzolli A, Bustos-Obregón E (2004) Update on the impact of Chlamydia trachomatis infection on male fertility. *Andrologia* 36: 1-23.
- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z (1993a) Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53: 1945-1951.
- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z (1993b) Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 207: 202-205.
- Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Núñez R (2009a) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril* 92: 170-173.
- Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez EI, Núñez R, Fernández JL, Caballero P, López-Fernández C, Holt WV (2009b) A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril* 92: 1915-1919.

- Gosálvez J, de la Torre J, López-Fernández C, Pérez-Gutiérrez L, Ortega L, Caballero P, Núñez R (2010) DNA fragmentation dynamics in fresh versus frozen thawed plus gradient-isolated human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med* 56: 27-36.
- Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL (2011a) Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test: technical aspects and clinical applications. In: *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Application in Male Infertility and Assisted Reproduction*; Chap. 10, pp. 151-170. Edited by Zini A, Agarwal A. New York: Springer.
- Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Gouraud A, Holt WV (2011b) Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev* 78: 951-961.
- Gosálvez J, Caballero P, López-Fernández C, Ortega L, Guijarro JA, Fernández JL, Johnston SD, Núñez-Calonge R (in press) Can DNA fragmentation of neat or swim-up spermatozoa be used to predict pregnancy following ICSI of fertile oocyte donors? *Asian J Androl*, in Press.
- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 271: 3459-3469.
- Grishko VI, Druzhyina N, LeDoux SP, Wilson GL (1999) Nitric oxide-induced damage to mtDNA and its subsequent repair. *Nucleic Acids Res* 27: 4510-4516.
- Grunewald S, Sharma R, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A (2009) Impact of caspase activation in human spermatozoa. *Microsc Res Tech* 72: 878-888.
- Gu LJ, Chen ZW, Chen ZJ, Xu JF, Li M (2009) Sperm chromatin anomalies have an adverse effect on the outcome of conventional in vitro fertilization: a study with strictly controlled external factors. *Fertil Steril* 92: 1344-1346.
- Günyeli I, Abike F, Dunder I, Aslan C, Tapisiz OL, Temizkan O, Payasli A, Erdemoglu E (2011) Chlamydia, Mycoplasma and Ureaplasma infections in infertile couples and effects of these infections on fertility. *Arch Gynecol Obstet* 283: 379-385.
- Habermann B, Krause W (1999) Altered sperm function or sperm antibodies are not associated with chlamydial antibodies in infertile men with leucocytospermia. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 12: 25-29.

- Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I (1998) DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Adv Exp Med Biol* 444: 79-91.
- Haines GA, Hendry JH, Daniel CP, Morris ID (2002) Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biol Reprod* 67: 854-861.
- Hall EJ, Giaccia AJ (2006) Hyperthermia. In: *Radiobiology for the radiologist*, 6th edn; Chap. 28, pp. 469-490. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K, Schmidt W (1996) 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* 11: 2468-2471.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460: 473-478.
- Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S (2002) The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 346: 725-730.
- Hansen M, Colvin L, Petterson B, Kurinczuk JJ, de Klerk N, Bower C (2008) Admission to hospital of singleton children born following assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod* 23: 1297-1305.
- Hargreave T (2000) Genetically determined male infertility and assisted reproduction techniques. *J Endocrinol Invest* 23: 697-710.
- Harrison R, Weiner J (1948) Abdomino-testicular temperature gradients. *J Physiol* 18: 256-262.
- Hazra TK, Hill JW, Izumi T, Mitra S (2001) Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential in vivo functions. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 193-205.
- Hemann MT, Rudolph KL, Strong MA, DePinho RA, Chin L, Greider CW (2001) Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Mol Biol Cell* 12: 2023-2030.

- Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF (2003) DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* 7: 477-484.
- Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF (2005) Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 83: 635-642.
- Herrero MB, Gagnon C (2001) Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *J Androl* 22: 349-356.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 107.
- Hosseinzadeh S, Brewis IA, Eley A, Pacey AA (2001) Co-incubation of human spermatozoa with Chlamydia trachomatis serovar E causes premature sperm death. *Hum Reprod* 16: 293-299.
- Hosseinzadeh S, Pacey AA, Eley A (2003) Chlamydia trachomatis-induced death of human spermatozoa is caused primarily by lipopolysaccharide. *J Med Microbiol* 52: 193-200.
- Hosseinzadeh S, Eley A, Pacey AA (2004) Semen quality of men with asymptomatic chlamydial infection. *J Androl* 25: 104-109.
- Host E, Lindenberg S, Kahn JA, Christensen F (1999) DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet Gynecol Scand* 78: 336-339.
- Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S (2000) The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79: 559-563.
- Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ (2008) Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 44: 235-246.
- Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS (2005) Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 84: 130-140.

- Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R (1993) Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 1347-1354.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W (1996) A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 2: 613-619.
- Idahl A, Boman J, Kumlin U, Olofsson JI (2004) Demonstration of Chlamydia trachomatis IgG antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduced likelihood of achieving pregnancy. *Hum Reprod* 19: 1121-1126.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 21: 33-44.
- Ivell R (2007) Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reprod Biol Endocrinol* 5: 15.
- Iwasaki A, Gagnon C (1992) Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 57: 409-416.
- Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta EL, Serafini PC, Smith GD (2010) Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 94: 2626-2630.
- Jakiel G, Robak-Cholubek D, Wieczorek P, Bokinić M (2004) Evaluation of some parameters of human semen with positive chlamydial reaction. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med* 59: 61-64.
- Jeyendran R (2000) *Interpretation of semen analysis results. A practical guide.* UK: Cambridge University Press.
- Jones R, Mann T, Sherins R (1979) Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31: 531-537.
- Jungwirth A, Straberger A, Esterbauer B, Fink K, Schmeller N (2003) Acrosome reaction in Chlamydia-positive and negative patients. *Andrologia* 35: 314-316.

- Karabinus DS, Vogler CJ, Saacke RG, Evenson DP (1997) Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. *J Androl* 18: 549-555.
- Kasai H (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 387: 147-163.
- Kawanishi S, Oikawa S (2004) Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 1019: 278-284.
- Keefe DL, Franco S, Liu L, Trimarchi J, Cao B, Weitzen S, Agarwal S, Blasco MA (2005) Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women--toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am J Obstet Gynecol* 192: 1256-1260.
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27: 247-254.
- Kierszenbaum AL (2001) Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev* 58: 357-358.
- Kilic D, Basar MM, Kaygusuz S, Yilmaz E, Basar H, Batislam E (2004) Prevalence and treatment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, and Mycoplasma hominis in patients with non-gonococcal urethritis. *Jpn J Infect Dis* 57: 17-20.
- Kimmins S, Sassone-Corsi P (2005) Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434: 583-589.
- Kleinhaus K, Perrin M, Friedlander Y, Paltiel O, Malaspina D, Harlap S (2006) Paternal age and spontaneous abortion. *Obstet Gynecol* 108: 369-377.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T (1997) Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 68: 519-524.
- Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ (2011) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* 436: 687-698.
- Kundu TK, Rao MR (1995) DNA condensation by the rat spermatidal protein TP2 shows GC-rich sequence preference and is zinc dependent. *Biochemistry* 34: 5143-5150.

- Kundu TK, Rao MR (1996) Zinc dependent recognition of a human CpG island sequence by the mammalian spermatidal protein TP2. *Biochemistry* 35: 15626-15632.
- Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R (1996) Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol Reprod* 55: 789-795.
- Laberge RM, Boissonneault G (2005) On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* 73: 289-296.
- Lansdorp PM (2009) Telomeres and disease. *EMBO J* 28: 2532-2540.
- Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP (2000) Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15: 1717-1722.
- Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G (2008) DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod* 78: 324-332.
- Lemarie A, Huc L, Pazarentzos E, Mahul-Mellier AL, Grimm S (2011) Specific disintegration of complex II succinate:ubiquinone oxidoreductase links pH changes to oxidative stress for apoptosis induction. *Cell Death Differ* 18: 338-349.
- Levesque D, Veilleux S, Caron N, Boissonneault G (1998) Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 602-609.
- Lewis JD, Song Y, de Jong ME, Bagha SM, Ausió J (2003) A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 111: 473-482.
- Lewis JD, Saperas N, Song Y, Zamora MJ, Chiva M, Ausió J (2004) Histone H1 and the origin of protamines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4148-4152.
- Li Z, Wang L, Cai J, Huang H (2006) Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 23: 367-376.
- Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM (2008) Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 90: 352-359.

- Ling J, Soll D (2010) Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4028-4033.
- Liu L, Blasco M, Trimarchi J, Keefe D (2002) An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev Biol* 249: 74-84.
- Liu L, Bailey SM, Okuka M, Muñoz P, Li C, Zhou L, Wu C, Czerwiec E, Sandler L, Seyfang A, Blasco MA, Keefe DL (2007) Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 9: 1436-1441.
- Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, Olsen J, Scheike T, Poulsen HE, Bonde JP (2003) Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod* 18: 1265-1272.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF (1998) Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13: 896-900.
- Love CC, Kenney RM (1999) Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod* 60: 615-620.
- Lu Z, Zhang C, Zhai Z (2005) Nucleoplasmin regulates chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2778-2783.
- Luderus ME, van Steensel B, Chong L, Sibon OC, Cremers FF, de Lange T (1996) Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol* 135: 867-881.
- Ludwig AK, Katalinic A, Thyen U, Sutcliffe AG, Diedrich K, Ludwig M (2009) Physical health at 5.5 years of age of term-born singletons after intracytoplasmic sperm injection: results of a prospective, controlled, single-blinded study. *Fertil Steril* 91: 115-124.
- Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee SW, Aaronson SA (2003) Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol* 23: 8576-8585.
- Makhlouf AA, Niederberger C (2006) DNA integrity tests in clinical practice: it is not a simple matter of black and white (or red and green). *J Androl* 27: 316-323.

- Makler A, David R, Blumenfeld Z, Better OS (1981) Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertil Steril* 36: 507-511.
- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 52: 864-867.
- Mann SL, Patton WC, King A, Chan PJ (2002) Comparative genomic hybridization analysis of sperm DNA apoptosis after exposure to heat shock. *J Assist Reprod Genet* 19: 195-200.
- Marcon L, Boissonneault G (2004) Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 70: 910-918.
- Marchetti F, Wyrobek AJ (2005) Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75: 112-129.
- Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ (2007) Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17725-17729.
- Martelli AM, Zweyer M, Ochs RL, Tazzari PL, Tabellini G, Narducci P, Bortul R (2001) Nuclear apoptotic changes: an overview. *J Cell Biochem* 82: 634-646.
- Martins RP, Krawetz SA (2005) RNA in human sperm. *Asian J Androl* 7: 115-120.
- Matsuura R, Takeuchi T, Yoshida A (2010) Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. *Asian J Androl* 12: 753-759.
- McPherson SM, Longo FJ (1992) Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev* 31: 268-279.
- McPherson SM, Longo FJ (1993) Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 158: 122-130.

- McVicar CM, McClure N, Williamson K, Dalzell LH, Lewis SE (2004) Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril* 81: 767-774.
- Meistrich ML (1993) Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 23: 136-141.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111: 483-488.
- Melis GB, Ibba MT, Steri B, Kotsonis P, Matta V, Paoletti AM (2000) [Role of pH as a regulator of vaginal physiological environment]. *Minerva Ginecol* 52: 111-121.
- Meseguer M, Garrido N, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Martínez-Jabaloyas JM, Gil-Salom M (2003) Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum Reprod* 18: 1281-1285.
- Meseguer M, Molina N, García-Velasco JA, Remohí J, Pellicer A, Garrido N (2006) Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year follow-up study. *Fertil Steril* 85: 640-645.
- Meyer-Ficca ML, Scherthan H, Burkle A, Meyer RG (2005) Poly(ADP-ribose)ylation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma* 114: 67-74.
- Meyer-Ficca ML, Lonchar J, Credidio C, Ihara M, Li Y, Wang ZQ, Meyer RG (2009) Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biol Reprod* 81: 46-55.
- Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, Meistrich ML, Austin CA, Meyer RG (2011) Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol Reprod* 84: 900-909.
- Micinski P, Pawlicki K, Wielgus E, Bochenek M, Tworkowska I (2009) The sperm chromatin structure assay (SCSA) as prognostic factor in IVF/ICSI program. *Reprod Biol* 9: 65-70.
- Mieusset R, Bujan L, Mondinat C, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H (1987) Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril* 48: 1006-1011.
- Mieusset R, Bengoudifa B, Bujan L (2007) Effect of posture and clothing on scrotal temperature in fertile men. *J Androl* 28: 170-175.

- Mitropoulos D, Deliconstantinos G, Zervas A, Villiotou V, Dimopoulos C, Stavrides J (1996) Nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities in the spermatic vein of patients with varicocele: a potential role for nitric oxide and peroxynitrite in sperm dysfunction. *J Urol* 156: 1952-1958.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Mortimer D (2000) The future of male infertility management and assisted reproduction technology. *Hum Reprod* 15: 98-110.
- Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB (2010) Disruption of telomere-telomere interactions associated with DNA damage in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med* 56: 407-412.
- Motrich RD, Cuffini C, Oberti JP, Maccioni M, Rivero VE (2006) Chlamydia trachomatis occurrence and its impact on sperm quality in chronic prostatitis patients. *J Infect* 53: 175-183.
- Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, Jr., Agarwal A (2004) Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 19: 129-138.
- Mudrak O, Chandra R, Jones E, Godfrey E, Zalensky A (2009) Reorganisation of human sperm nuclear architecture during formation of pronuclei in a model system. *Reprod Fertil Dev* 21: 665-671.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, Maggi M (2000) Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 21: 903-912.
- Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, de los Santos MJ, Meseguer M (2006a) Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 85: 371-383.
- Muriel L, Meseguer M, Fernández JL, Álvarez J, Remohí J, Pellicer A, Garrido N (2006b) Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod* 21: 738-744.
- Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365.

- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M (2005) Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 11: 198-205.
- Naysmith TE, Blake DA, Harvey VJ, Johnson NP (1998) Do men undergoing sterilizing cancer treatments have a fertile future? *Hum Reprod* 13: 3250-3255.
- Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, Wu SH, Ott S, Garant MJ, Blackburn EH, Mitchell BD, Shuldiner AR, Hsueh WC (2007) Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12135-12139.
- Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, Meseguer MA (1998) Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13: 2756-2761.
- Núñez-Calonge R, Caballero P, López-Fernández C, Guijarro JA, Fernández JL, Johnston S, Gosálvez J (2012) An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reprod Sci* 19: 1163-1168.
- O'Donovan M (2005) An evaluation of chromatin condensation and DNA integrity in the spermatozoa of men with cancer before and after therapy. *Andrologia* 37: 83-90.
- O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B (2008) Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 23: 1044-1052.
- O'Neill P, Fielden EM (1993) Primary radical process in DNA. *Adv Radiat Biol* 17: 53-120.
- Ochsendorf FR, Ozdemir K, Rabenau H, Fenner T, Oremek R, Milbradt R, Doerr HW (1999) Chlamydia trachomatis and male infertility: chlamydia-IgA antibodies in seminal plasma are C. trachomatis specific and associated with an inflammatory response. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 12: 143-152.
- Ogura A, Matsuda J, Yanagimachi R (1994) Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7460-7462.

- Oikawa S, Kawanishi S (1999) Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett* 453: 365-368.
- Oikawa S, Tada-Oikawa S, Kawanishi S (2001) Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry* 40: 4763-4768.
- Oliva R, Mezquita J, Mezquita C, Dixon GH (1988) Haploid expression of the rooster protamine mRNA in the postmeiotic stages of spermatogenesis. *Dev Biol* 125: 332-340.
- Oliva R, Dixon GH (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 40: 25-94.
- Oliva R (2006) Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12: 417-435.
- Oliva R, Castillo J (2011) Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl* 13: 24-30.
- Ollero M, Gil-Guzman E, López MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ, Jr., Álvarez JG (2001) Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 16: 1912-1921.
- Ostling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298.
- Ozbek E, Turkoz Y, Gokdeniz R, Davarci M, Ozugurlu F (2000) Increased nitric oxide production in the spermatic vein of patients with varicocele. *Eur Urol* 37: 172-175.
- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ (2004) Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 81: 802-809.
- Paavonen J, Eggert-Kruse W (1999) Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 5: 433-447.
- Pandita TK, Pandita S, Bhaumik SR (2009) Molecular parameters of hyperthermia for radiosensitization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19: 235-251.

- Paul C, Murray AA, Spears N, Saunders PT (2008) A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction* 136: 73-84.
- Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK (2005) Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 84: 356-364.
- Pérez-Crespo M, Pintado B, Gutiérrez-Adán A (2008) Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev* 75: 40-47.
- Perreault SD, Zirkin BR (1982) Sperm nuclear decondensation in mammals: role of sperm-associated proteinase in vivo. *J Exp Zool* 224: 253-257.
- Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, Morris ID, Morris RA, Robbins WA, Sakkas D, Spano M, Wyrobek AJ (2003) Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol* 518: 253-268.
- Petersen PM, Skakkebaek NE, Rorth M, Giwercman A (1999) Semen quality and reproductive hormones before and after orchiectomy in men with testicular cancer. *J Urol* 161: 822-826.
- Place I, Englert Y (2003) A prospective longitudinal study of the physical, psychomotor, and intellectual development of singleton children up to 5 years who were conceived by intracytoplasmic sperm injection compared with children conceived spontaneously and by in vitro fertilization. *Fertil Steril* 80: 1388-1397.
- Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A (2000) Association of ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *J Urol* 163: 1775-1778.
- Pradeepa MM, Rao MR (2007) Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Soc Reprod Fertil Suppl* 63: 1-10.
- Ragni G, Arnoldi M, Somigliana E, Paffoni A, Brambilla ME, Restelli L (2005) Reproductive prognosis in male patients with azoospermia at the time of cancer diagnosis. *Fertil Steril* 83: 1674-1679.
- Reiter TA (2006) NO* chemistry: a diversity of targets in the cell. *Redox Rep* 11: 194-206.

- Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J (2002) *Reproducción humana*, 2nd edn. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Ren J-G, Xia H-L, Just T, Dai Y-R (2001) Hydroxyl radical-induced apoptosis in human tumor cells is associated with telomere shortening but not telomerase inhibition and caspase activation. *FEBS Lett* 488: 123-132.
- Ribeiro TM, Bertolla RP, Spaine DM, Fraietta R, Ortiz V, Cedenho AP (2008) Sperm nuclear apoptotic DNA fragmentation in men with testicular cancer. *Fertil Steril* 90: 1782-1786.
- Risley MS, Einheber S, Bumcrot DA (1986) Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma* 94: 217-227.
- Rivero MT, Vázquez-Gundín F, Muriel L, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL (2003) Patterns of DNA migration in two-dimensional single-cell gel electrophoresis analyzed by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Environ Mol Mutagen* 42: 223-227.
- Robbins WA, Meistrich ML, Moore D, Hagemester FB, Weier HU, Cassel MJ, Wilson G, Eskenazi B, Wyrobek AJ (1997) Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nat Genet* 16: 74-78.
- Roca J, Mezquita C (1989) DNA topoisomerase II activity in nonreplicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids. *EMBO J* 8: 1855-1860.
- Rodman TC, Pruslin FH, Allfrey VG (1982) Mechanisms of displacement of sperm basic nuclear proteins in mammals. An in vitro simulation of post-fertilization results. *J Cell Sci* 53: 227-244.
- Rueffer U, Breuer K, Josting A, Lathan B, Sieber M, Manzke O, Grotenhermen FJ, Tesch H, Bredenfeld H, Koch P, Nisters-Backes H, Wolf J, Engert A, Diehl V (2001) Male gonadal dysfunction in patients with Hodgkin's disease prior to treatment. *Ann Oncol* 12: 1307-1311.
- Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y (1999) Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401: 168-173.
- Said TM, Tellez S, Evenson DP, Del Valle AP (2009) Assessment of sperm quality, DNA integrity and cryopreservation protocols in men diagnosed with testicular and systemic malignancies. *Andrologia* 41: 377-382.

- Sailer BL, Jost LK, Erickson KR, Tajiran MA, Evenson DP (1995) Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Environ Mol Mutagen* 25: 23-30.
- Sakkas D, Manicardi G, Bianchi PG, Bizzaro D, Bianchi U (1995) Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 52: 1149-1155.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U (1999) Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 4: 31-37.
- Sakkas D, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG (2000) Possible consequences of performing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with sperm possessing nuclear DNA damage. *Hum Fertil (Camb)* 3: 26-30.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66: 1061-1067.
- Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D (2003) Sperm nuclear damage in the human. In: *Advances in male mediated developmental toxicity*, pp. 73-84. Edited by Robaire B, Hales BF. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Álvarez JG (2002a) Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 78: 1215-1224.
- Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Álvarez JG, Thomas AJ, Jr., Sharma RK (2002b) Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 78: 313-318.
- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ (2003a) Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 79: 1597-1605.
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ, Jr. (2003b) Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 80: 1431-1436.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Satta A, Stivala A, Garozzo A, Morello A, Perdichizzi A, Vicari E, Salmeri M, Calogero AE (2006) Experimental Chlamydia trachomatis infection causes apoptosis in human sperm. *Hum Reprod* 21: 134-137.
- Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken RJ (2003) Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutat Res* 529: 21-34.
- Schmid TE, Kamischke A, Bollwein H, Nieschlag E, Brinkworth MH (2003) Genetic damage in oligozoospermic patients detected by fluorescence in-situ hybridization, inverse restriction site mutation assay, sperm chromatin structure assay and the Comet assay. *Hum Reprod* 18: 1474-1480.
- Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G (2005a) Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Hum Reprod* 20: 1921-1927.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G (2005b) Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 20: 3446-3451.
- Sergerie M, Mieusset R, Croute F, Daudin M, Bujan L (2007) High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. *Fertil Steril* 88: 970.
- Seshagiri PB (2001) Molecular insights into the causes of male infertility. *J Biosci* 26: 429-435.
- Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS (2007a) The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J Cell Biochem* 102: 680-688.
- Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS (2007b) Function of the sperm nuclear matrix. *Arch Androl* 53: 135-140.
- Shamsi MB, Imam SN, Dada R (2011) Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet* 28: 1073-1085.
- Sharma RK, Agarwal A (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48: 835-850.
- Shen HM, Chia SE, Ong CN (1999) Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 20: 718-723.

- Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E (2005) Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Hum Reprod* 20: 452-455.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418.
- Singh J, Rao MR (1987) Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids in vitro. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal denaturation studies. *J Biol Chem* 262: 734-740.
- Singh J, Rao MR (1988) Interaction of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle. *Biochem Int* 17: 701-710.
- Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD, Schneider EL (1989) Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res* 184: 461-470.
- Singh NP (2000) A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 256: 328-337.
- Sinha Hikim AP, Swerdloff RS (1999) Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4: 38-47.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16: 972-978.
- Smit M, van Casteren NJ, Wildhagen MF, Romijn JC, Dohle GR (2010) Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum Reprod* 25: 1877-1883.
- Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Morales I, Ríos R, Castro A (2007) Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress. *Rev Med Chil* 135: 279-286.
- Sotolongo B, Lino E, Ward WS (2003) Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod* 69: 2029-2035.
- Spano M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L (1999) Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol Hum Reprod* 5: 29-37.

- Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G (2000) Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 73: 43-50.
- Spermon JR, Ramos L, Wetzels AM, Sweep CG, Braat DD, Kiemeny LA, Witjes JA (2006) Sperm integrity pre- and post-chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Hum Reprod* 21: 1781-1786.
- Stahl O, Eberhard J, Cavallin-Stahl E, Jepson K, Friberg B, Tingsmark C, Spano M, Giwercman A (2009) Sperm DNA integrity in cancer patients: the effect of disease and treatment. *Int J Androl* 32: 695-703.
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M (1998) Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 4: 939-945.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
- Szabo C, Ohshima H (1997) DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1: 373-385.
- Tarozzi N, Nadalini M, Stronati A, Bizzaro D, Dal Prato L, Coticchio G, Borini A (2009) Anomalies in sperm chromatin packaging: implications for assisted reproduction techniques. *Reprod Biomed Online* 18: 486-495.
- Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH (2009) Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 91: 1119-1126.
- Taylor BD, Darville T, Tan C, Bavoil PM, Ness RB, Haggerty CL (2011) The role of Chlamydia trachomatis polymorphic membrane proteins in inflammation and sequelae among women with pelvic inflammatory disease. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011: 989762.
- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S (1984) A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 42: 87-91.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 19: 611-615.
- Thilagavathi J, Kumar M, Mishra SS, Venkatesh S, Kumar R, Dada R (2012a) Analysis of sperm telomere length in men with idiopathic infertility. *Arch Gynecol Obstet* 287: 803-807.

- Thilagavathi J, Venkatesh S, Dada R (2012b) Telomere length in reproduction. *Andrologia* 45: 289-304.
- Thomson AB, Campbell AJ, Irvine DC, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH (2002) Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. *Lancet* 360: 361-367.
- Thomson LK, Zieschang JA, Clark AM (2011) Oxidative deoxyribonucleic acid damage in sperm has a negative impact on clinical pregnancy rate in intrauterine insemination but not intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 96: 843-847.
- Thonneau P, Bujan L, Multigner L, Mieusset R (1998) Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Hum Reprod* 13: 2122-2125.
- Tomita M (2010) Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death. *J Radiat Res* 51: 493-501.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D (2001) Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 16: 2160-2165.
- Tomsu M, Sharma V, Miller D (2002) Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 17: 1856-1862.
- Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R (2006) Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 21: 2084-2089.
- Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT, Jr. (2011) Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet* 7: e1002161.
- Tremellen K (2008) Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14: 243-258.
- Tsanev R, Avramova Z (1981) Nonprotamine nucleoprotein ultrastructures in mature ram sperm nuclei. *Eur J Cell Biol* 24: 139-145.
- Turner BM (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* 111: 285-291.

- van der Heijden GW, Derijck AA, Ramos L, Giele M, van der Vlag J, de Boer P (2006) Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol* 298: 458-469.
- van der Heijden GW, Ramos L, Baart EB, van den Berg IM, Derijck AA, van der Vlag J, Martini E, de Boer P (2008) Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* 8: 34.
- Varghese AC, Bragais FM, Mukhopadhyay D, Kundu S, Pal M, Bhattacharyya AK, Agarwal A (2009) Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia* 41: 207-215.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999) Cell death in development. *Cell* 96: 245-254.
- Vélez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jiménez C, Wittemer C, Thonneau P (2008) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril* 90: 1792-1799.
- Vesey CJ, Stringer M, Cole PV (1990) Decay of nitroprusside. I: In vitro. *Br J Anaesth* 64: 696-703.
- Vežnik Z, Pospisil L, Svecova D, Zajicova A, Unzeitig V (2004) Chlamydiae in the ejaculate: their influence on the quality and morphology of sperm. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83: 656-660.
- Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM (2002) Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrologia* 34: 155-161.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP (2004) 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* 81: 1289-1295.
- Vogelstein B, Pardoll DM, Coffey DS (1980) Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. *Cell* 22: 79-85.
- von Sonntag C (1984) Carbohydrate radicals: from ethylene glycol to DNA strand breakage. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 46: 507-519.
- Von Sonntag C (1987) *The chemical basis of radiation biology*. London: Taylor & Francis.

- Wang JC (2009) A journey in the world of DNA rings and beyond. *Annu Rev Biochem* 78: 31-54.
- Ward WS, Partin AW, Coffey DS (1989) DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 98: 153-159.
- Ward WS, Coffey DS (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44: 569-574.
- Ward WS (1993) Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 48: 1193-1201.
- Ward WS, Kimura Y, Yanagimachi R (1999) An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. *Biol Reprod* 60: 702-706.
- Ward WS (2010) Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 16: 30-36.
- Ward WS (2011) Regulating DNA supercoiling: sperm points the way. *Biol Reprod* 84: 841-843.
- Weidner W, Floren E, Zimmermann O, Thiele D, Ludwig M (1996) Chlamydial antibodies in semen: search for "silent" chlamydial infections in asymptomatic andrological patients. *Infection* 24: 309-313.
- Wen J, Jiang J, Ding C, Dai J, Liu Y, Xia Y, Liu J, Hu Z (2012) Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertil Steril* 97: 1331-1337.
- Wikstrand MH, Niklasson A, Stromland K, Hellstrom A (2008) Abnormal vessel morphology in boys born after intracytoplasmic sperm injection. *Acta Paediatr* 97: 1512-1517.
- Wiszniewska B, Kurzawa R, Ciechanowicz A, Machalinski B (1997) Inducible nitric oxide synthase in the epithelial epididymal cells of the rat. *Reprod Fertil Dev* 9: 789-794.
- World Health Organization (1999) *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 4th edn. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- World Health Organization (2001) *Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates*. Geneva: WHO.

- World Health Organization (2010) *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5th edn. Switzerland: WHO Press.
- Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P, Sautiere P (1998) Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 80: 117-128.
- Wykes SM, Krawetz SA (2003) The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 278: 29471-29477.
- Yamauchi Y, Shaman JA, Boaz SM, Ward WS (2007a) Paternal pronuclear DNA degradation is functionally linked to DNA replication in mouse oocytes. *Biol Reprod* 77: 407-415.
- Yamauchi Y, Shaman JA, Ward WS (2007b) Topoisomerase II-mediated breaks in spermatozoa cause the specific degradation of paternal DNA in fertilized oocytes. *Biol Reprod* 76: 666-672.
- Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF (2001) Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 16: 1950-1953.
- Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, Weil MM, Behringer RR, Meistrich ML (2000) Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4683-4688.
- Zalensky AO, Allen MJ, Kobayashi A, Zalenskaya IA, Balhorn R, Bradbury EM (1995) Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 103: 577-590.
- Zalensky AO, Tomilin NV, Zalenskaya IA, Teplitz RL, Bradbury EM (1997) Telomere-telomere interactions and candidate telomere binding protein(s) in mammalian sperm cells. *Exp Cell Res* 232: 29-41.
- Zhang HB, Lu SM, Ma CY, Wang L, Li X, Chen ZJ (2008) Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl* 10: 227-235.
- Zhang LH, Qiu Y, Wang KH, Wang Q, Tao G, Wang LG (2010) Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick-end labeling assay. *Fertil Steril* 94: 1027-1032.

- Zhao M, Shirley CR, Yu YE, Mohapatra B, Zhang Y, Unni E, Deng JM, Arango NA, Terry NH, Weil MM, Russell LD, Behringer RR, Meistrich ML (2001) Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* 21: 7243-7255.
- Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer RR, Boissonneault G, Yanagimachi R, Meistrich ML (2004) Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 38: 200-213.
- Zini A, de Lamirande E, Gagnon C (1993) Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 16: 183-188.
- Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT (2001) Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 75: 674-677.
- Zini A, Fischer MA, Sharir S, Shayegan B, Phang D, Jarvi K (2002) Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology* 60: 1069-1072.
- Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K (2005) Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod* 20: 3476-3480.
- Zini A, Libman J (2006) Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 175: 495-500.
- Zini A (2011) Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med* 57: 78-85.

Apéndice I
Abreviaturas



8-oxoG (8-oxoguanina): 8-oxo-7,8-dihidro-2' desoxiguanina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIFM: factor de inducción de la apoptosis, asociado a las mitocondrias; *apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated*

AKT: proteína quinasa serina/treonina

AO: naranja de acridina; *acridine orange*

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNt: ácido ribonucleico transferente

ATP: trifosfato de adenosina; *adenosine triphosphate*

AUC: area bajo la curva; *area under the curve*

BAD: promotor de muerte celular asociado a BCL-2; *BCL-2-associated death promotor*

BAK: proteína destructora del antagonista homólogo BCL-2; *BCL-2-antagonist killer*

BAX: proteína X asociada a BCL-2; *BCL-2-associated X protein*

BSA: albúmina de suero bovino; *bovine serum albumin*

CAD: DNasa activada por caspasas; *caspase-activated DNase*

cm: centímetro

CMA₃: cromomicina A₃

Cq: ciclo de cuantificación

DAPI: 4',6-diaminofenil-2-indol

DBD-FISH: detección de roturas en el ADN por hibridación *in situ* fluorescente; *DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization*

DFI: índice de fragmentación del ADN; *DNA fragmentation index*

DNasa: desoxirribonucleasa

DTT: ditioneitol

dUTP: trifosfato de desoxiuridina; *deoxyuridine triphosphate*

EDTA: ácido etilendiamonotetraacético

ENDOg: endonucleasa G

FITC: isotiocianato de fluoresceína; *fluorescein isothiocyanate*

FIV: fecundación *in vitro*

g: gramo

GC: guanina-citosina

GPx5: glutatión peroxidasa 5

Gy: gray

h: hora

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HCl: ácido clorhídrico

HTF: fluido tubárico humano; *human tubal fluid*

IC: intervalo de confianza

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides; *intracytoplasmic sperm injection*

ISNT: marcaje por traslado de mella; *in situ nick translation*

IUI: inseminación intrauterina; *intrauterine insemination*

kb: kilobase

kDa: kilodalton

M: molar

m: metro

MAR: región de anclaje a la matriz; *matrix attachment region*

MeV: megaelectronvoltio

MgCl₂: cloruro de magnesio

min: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar

n: tamaño muestral

N₂O₃: anhídrido nitroso

NaCl: cloruro de sodio

NAD: dinucleótido de nicotinamida y adenina

ng: nanogramo

nM: nanomolar

NO•: óxido nítrico

°: grado

°C: grado Celsius

O₂⁻: anión superóxido

•OH: radical hidroxilo

OMS: organización mundial de la salud; *WHO, world health organization*

ONOO⁻: peroxinitrito

OR: razón de probabilidades; *odds ratio*

PAR: poli (ADP-ribosa)

PARG: poli (ADP-ribosa) glucohidrolasa

PARP1: poli (ADP-ribosa) polimerasa 1

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino; *phosphate buffered saline*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; *polymerase chain reaction*

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

PMP: proteína polimórfica de membrana; *polymorphic membrane protein*

PRM: protamina

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR cuantitativa); *quantitative polymerase chain reaction*

RNS: especies reactivas de nitrógeno; *reactive nitrogen species*

ROC: característica operativa del receptor; *receiver operating characteristic*

ROS: especies reactivas de oxígeno; *reactive oxygen species*

SCD: dispersión de la cromatina espermática; *sperm chromatin dispersion*

SCGE: electroforesis en gel de células aisladas; *single cell gel electrophoresis*

SCSA: ensayo de la estructura de la cromatina espermática; *sperm chromatin structure assay*

SDF: fragmentación del ADN espermático; *sperm DNA fragmentation*

SDS: dodecilsulfato sódico

SNP: nitroprusiato de sodio; *sodium nitroprusside*

SOD: superóxido dismutasa

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal; *terminal deoxynucleotidyl transferase*

TNP: proteína de transición

TOP2B: topoisomerasa II β

Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato

TUNEL: marcaje del extremo libre por dUTP mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal; *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling*

ua: unidades arbitrarias

μl: microlitro

Apéndice II

Índice de figuras y tablas



Índice de figuras

Figura 1. Morfología de un espermatozoide humano maduro normal (Alberts <i>et al.</i> 1994).	28
Figura 2. (A) Corte transversal de un testículo humano. Dibujo de un corte de parafina 2,5×. (B) Disposición de los túbulos seminíferos y del epidídimo en el testículo humano. Dibujo esquemático. (C) Sección transversal de un túbulo seminífero de un hombre fértil de 32 años. Dibujo de una sección fina 300×. (D) Las células de Sertoli dividen el epitelio germinal en compartimento basal y adluminal (Holstein <i>et al.</i> 2003).	29
Figura 3. Pasos de la diferenciación de las espermátidas: (1) Espermátidas inmaduras con el núcleo (N) con forma redonda. La vesícula acrosómica (A) está unida al núcleo. (2) La vesícula acrosómica ha aumentado y se ha aplanado sobre el núcleo. La cola contacta con el núcleo. (3-8) Formación del acrosoma, condensación nuclear y desarrollo de las estructuras de la cola. La espermátida madura (8) es liberada del epitelio germinal. Dibujo esquemático basado en imágenes del microscopio electrónico (Holstein <i>et al.</i> 2003).	32
Figura 4. Cinética de la espermatogénesis. Los ciclos (4,5) y estadios (6) de la espermatogénesis se disponen según un patrón helicoidal. Tipos de espermatogonias: Ad (A oscura), Ap (A clara), B. Tipos de espermátocitos primarios: PL (preleptoteno), L (leptoteno), Z (zigoteno), P (paquiteno). Espermátocitos secundarios: II. Fases de la espermiogénesis: Sa (fase de Golgi), Sb1 y Sb2 (fase de capuchón), Sc (fase de acrosoma), Sd1 y Sd2 (fase de maduración) (Remohí <i>et al.</i> 2002).	33
Figura 5. Modelo propuesto por Meyer-Ficca <i>et al.</i> (2011) para explicar cómo TOP2B y PARP1 coordinan la relajación del ADN espermático con el intercambio nucleoproteico. TOP2B se une al ADN (1) y genera una rotura en la cadena de ADN (2). Esta rotura desencadena la activación de PARP y consecuentemente la síntesis de PAR (3). La modificación con PAR da lugar a la inactivación catalítica y a la liberación del complejo topoisomerasa-PARP del ADN, junto con otras proteínas aceptoras de PARP, como las histonas (4). Hipotéticamente, el ADN ahora está accesible para la unión con otras proteínas, como proteínas de transición (TNP1/2) y protaminas (PRM1/2). La degradación de PAR por medio de PARG es esencial para restaurar la actividad enzimática del complejo topoisomerasa-PARP que ha sido liberado del ADN (5). Tras eliminar las histonas y relajar el superenrollamiento del ADN, las regeneradas PARP y TOP2B pueden moverse a otro lugar de la cromatina y realizar las mismas acciones (1).	40

Figura 6. Representación de los tres principales elementos estructurales de la cromatina espermática. (A) Durante la espermiogénesis las histonas son reemplazadas por protaminas, que condensan el ADN en toroides fuertemente empaquetados. Cada toroide de protamina es un dominio bucle. (B) Los toroides de protaminas pueden estar organizados por apilamiento unos al lado de otros. Evidencias recientes sugieren que existen grandes extensiones de ADN que retienen histonas (solenoides verdes). Estas extensiones podrían ser dominios bucle completos que no han sido condensados por protaminas. (C) Las cadenas de ADN que unen los toroides de protaminas son sensibles a las nucleasas, y también podrían estar unidos a histonas. MAR, región de unión a la matriz (Ward 2010). 42

Figura 7. Herencia de los elementos estructurales de la cromatina espermática por el embrión. En espermátidas redondas el ADN se empaqueta por medio de histonas (arriba), pero durante la espermiogénesis la mayoría de las histonas son reemplazadas por protaminas (en medio, en rojo). Tras la fecundación, las protaminas son eliminadas y reemplazadas por histonas que proporciona el ovocito (abajo, en verde claro). Sin embargo, es probable que algunas histonas que fueron retenidas en el espermatozoide (en medio, en verde oscuro) sean retenidas tras la fecundación en el pronúcleo paterno. Las regiones de unión a la matriz nuclear espermática (MARs) probablemente también son retenidas en el pronúcleo paterno (Ward 2010). 46

Figura 8. Comparación entre las roturas inducidas por la TOP2B endógena del núcleo espermático y las inducidas mediante tratamiento con endonucleasas de restricción exógenas. La TOP2B puede ser inducida para que produzca roturas en el ADN en las zonas por las que se une a la matriz. Estas roturas no eliminan secuencias de ADN y son reversibles. Cuando se inyectan en ovocitos espermatozoides con roturas inducidas por TOP2B, el pronúcleo paterno se forma, pero no hay replicación del ADN. Por el contrario, cuando se elimina una gran parte del ADN espermático mediante endonucleasas de restricción exógenas, el ADN paterno es capaz de replicarse tras la ICSI. Esto sugiere que, para que se inicie la síntesis de ADN, es más importante que las MARs estén intactas que la integridad del ADN en sí misma (Shaman *et al.* 2007a). 47

Figura 9. Tipos de lesiones que podrían aparecer en el ADN de un espermatozoide humano a consecuencia del daño oxidativo (Aitken *et al.* 2009). 53

Figura 10. Hipótesis de dos pasos para explicar el origen del daño en el ADN de la línea germinal (Aitken & Curry 2011). 57

Figura 11. Espermatozoides obtenidos con el ensayo del cometa en dos dimensiones (2D), teñidos con Sybr green: (1) espermatozoide sin roturas; (2) espermatozoide con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena sencilla; (3) espermatozoide con un nivel alto de roturas de ADN de cadena sencilla; (4) espermatozoide con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena doble; (5) espermatozoide con un nivel alto de roturas de ADN de cadena doble; (6) espermatozoide con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena sencilla y doble; (7) espermatozoide con un nivel alto de roturas de ADN de cadena sencilla y doble (Enciso *et al.* 2009)..... 60

Figura 12. DBD-FISH en espermatozoides humanos. (izquierda) espermatozoides humanos teñidos con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol); (derecha) espermatozoides humanos tras DBD-FISH con sonda de genoma total (Fernández *et al.* 2000)..... 61

Figura 13. Nucleoides de espermatozoides humanos obtenidos con el test SCD. (arriba) Tinción Wright para microscopio de campo claro. (abajo) Tinción DAPI para microscopio de fluorescencia. 64

Figura 14. Espermatozoides humanos procesados mediante el test SCD y teñidos con Wright para microscopio de campo claro. (a) Nucleoide de halo grande. (b) Nucleoide de halo mediano. (c) Nucleoide de halo pequeño. (d) Nucleoide sin halo. (e) Nucleoide sin halo, degradado. (c), (d) y (e) contienen ADN fragmentado. 65

Figura 15. Esquema del protocolo para evaluar la SDF y la presencia de 8-oxoG de manera simultánea..... 93

Figura 16. Esquema de los protocolos utilizados para evaluar la SDF y la matriz proteica nuclear de manera simultánea..... 99

Figura 17. Células espermáticas de un donante fértil incubadas con agentes que inducen SDF, para el estudio simultáneo de la SDF (izquierda, tinción DAPI azul) y la presencia de 8-oxoG (derecha, marcaje FITC verde). Por motivos ilustrativos, se eligieron las imágenes de las dosis que indujeron SDF en el total de la población. (a y a') Células control no tratadas. Sólo los espermatozoides con el ADN fragmentado presentan marcaje de 8-oxoG. (b y b') H₂O₂ (5 mM). Todos los espermatozoides con el ADN fragmentado muestran un intenso marcaje de 8-oxoG. (c y c') SNP (50 mM). Sólo un espermatozoide con abundante 8-oxoG. El resto tienen el ADN fragmentado, pero sólo presentan un marcaje muy suave de 8-oxoG. (d y d') DNasa I (2,5 U). Todos los espermatozoides con el ADN fragmentado pero sin marcaje de 8-oxoG. 127

Figura 18. Frecuencias de marcaje de 8-oxoG en las diferentes categorías de tamaños de halo del test SCD (tasa de espermatozoides con 8-oxoG) en muestras que obtuvieron embarazo y muestras que no lo obtuvieron, tras ICSI. Total corresponde a la frecuencia de marcaje de 8-oxoG independientemente de la fragmentación. 130

Figura 19. Células espermáticas humanas tratadas con la solución de lisis fuerte (con SDS). Izquierda: Tinción de ADN con DAPI. Centro: Tinción de proteína con mercuridibromofluoresceína. Derecha: Fusión de las dos imágenes. *: Células con el ADN fragmentado. La tinción con DAPI muestra que los espermatozoides que no tienen el ADN fragmentado presentan halos de dispersión de bucles de ADN, mientras que las células que tienen el ADN fragmentado presentan grandes halos de difusión de fragmentos de ADN. La tinción de proteína muestra que sólo las células con el ADN fragmentado retienen una matriz proteica residual en un estado condensado y colapsado. 138

Figura 20. Células espermáticas humanas tratadas con una solución de lisis suave (sin SDS). Izquierda: Tinción de ADN con DAPI. Centro: Tinción de proteína con mercuridibromofluoresceína. Las colas de los espermatozoides se mantienen. Derecha: Fusión de las dos imágenes. *: Células con el ADN fragmentado. Las células con el ADN intacto presentan matrices proteicas homogéneas y tenuemente teñidas, mientras que las que tienen el ADN fragmentado presentan matrices densas y agregadas. 139

Figura 21. Células espermáticas humanas procesadas con el test SCD. Arriba: Tinción de ADN con DAPI. Abajo: Tinción de proteína con mercuridibromofluoresceína. *: Células con el ADN fragmentado. No se observaron diferencias en cuanto a la matriz proteica nuclear entre células fragmentadas y no fragmentadas. 140

Figura 22. Células espermáticas humanas intactas incluidas en un microgel. Izquierda: Tinción de ADN con DAPI. Derecha: Tinción de proteína con mercuridibromofluoresceína. No se observaron diferencias entre células. 140

Figura 23. Leucocitos humanos de sangre periférica tratados con la solución de lisis suave, sin SDS. Izquierda: Tinción de ADN con DAPI. Centro: Tinción de proteína con mercuridibromofluoresceína. Derecha: Fusión de las dos imágenes. *: Leucocito apoptótico. A diferencia de las células que no tienen el ADN fragmentado, los leucocitos apoptóticos retienen una matriz nuclear residual en un estado condensado y colapsado. 143

Figura 24. Porcentaje de células espermáticas con el ADN fragmentado en el semen fresco (antes de *swim-up*) y en la población de células seleccionadas por *swim-up* (después de *swim-up*) en 27 muestras espermáticas. Las muestras se ordenaron por frecuencia creciente de espermatozoides con el ADN fragmentado antes de *swim-up*. 148

Figura 25. Longitud media de la secuencia telomérica de los espermatozoides en el semen fresco (antes de *swim-up*) y en la población de células seleccionadas por *swim-up* (después de *swim-up*) en 27 muestras espermáticas. Las muestras se ordenaron por frecuencia creciente de espermatozoides con el ADN fragmentado antes de *swim-up*. 149

Figura 26. Porcentaje de células con el ADN fragmentado en los diferentes grupos de pacientes con cáncer. No se observaron diferencias significativas en los grupos estudiados. 155

Figura 27. Porcentaje de SDF en donantes fértiles, pacientes infértiles que consiguen embarazo tras el primer intento en un ciclo de FIV, pacientes infértiles que no consiguen embarazo tras el primer intento en un ciclo de FIV y pacientes con cáncer. La línea horizontal en la caja representa la mediana; la línea inferior de la caja indica el primer cuartil; la línea superior de la caja, el tercer cuartil; y los "bigotes" (los extremos de las líneas verticales) son el valor máximo y mínimo de los datos. Los puntos fuera de la caja representan valores anormales. 156

Figura 28. Porcentajes de células espermáticas de las diferentes categorías de tamaño de halo de acuerdo con el test SCD en el grupo de controles fértiles y en los pacientes infectados por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* 163

Figura 29. Porcentajes de células espermáticas de las diferentes categorías de tamaño de halo, de acuerdo con el test SCD, en el grupo control y en el grupo de pacientes infectados por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, antes y después del tratamiento con antibióticos. 165

Figura 30. Porcentaje de células con el ADN fragmentado con respecto al origen de la muestra (fresca o congelada-descongelada). También se representan los valores de fragmentación antes y después de la preparación de la muestra para reproducción asistida mediante la técnica de *swim-up*. *Diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$ 172

Figura 31. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante A tras la exposición a dosis crecientes de rayos-X y posterior incubación a 37°C y 45°C durante 24 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar. 187

Figura 32. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante B tras la exposición a dosis crecientes de rayos-X y posterior incubación a 37°C y 45°C durante 24 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.....	188
Figura 33. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante C tras la exposición a dosis crecientes de rayos-X y posterior incubación a 37°C y 45°C durante 24 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.....	189
Figura 34. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante D tras la exposición a 37°C, 41°C y 45°C, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 1 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.....	194
Figura 35. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante E tras la exposición a 37°C, 41°C y 45°C, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 1 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.....	195
Figura 36. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante F tras la exposición a 37°C, 41°C y 45°C, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 1 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.....	196
Figura 37. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante G tras la exposición a pH 8 (muestra original) y pH 4, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 1 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.....	199
Figura 38. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante H tras la exposición a pH 8 (muestra original) y pH 4, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 1 h. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.....	200
Figura 39. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante I tras la exposición a dosis crecientes de SNP, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 5 min. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.....	202
Figura 40. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante J tras la exposición a dosis crecientes de SNP, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 5 min. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar.....	203

Figura 41. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la muestra de espermatozoides del donante K tras la exposición a dosis crecientes de SNP, de forma crónica durante 24 h y aguda durante 5 min. El tiempo de supervivencia se da en media \pm desviación estándar..... 204

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentajes de los diferentes tamaños de halo obtenidos mediante el test SCD y de células marcadas intensamente con la sonda de 8-oxoG en una muestra espermática expuesta a diferentes dosis de H₂O₂ (60 min a 37°C). Las células espermáticas con el ADN fragmentado son las de halo pequeño, las sin halo y las sin halo y degradadas..... 124

Tabla 2. Porcentajes de los diferentes tamaños de halo obtenidos mediante el test SCD y de células marcadas intensamente con la sonda de 8-oxoG en una muestra espermática expuesta a diferentes dosis de SNP (60 min a 37°C). Las células espermáticas con el ADN fragmentado son las de halo pequeño, las sin halo y las sin halo y degradadas..... 125

Tabla 3. Porcentajes de los diferentes tamaños de halo obtenidos mediante el test SCD y de células marcadas intensamente con la sonda de 8-oxoG en una muestra espermática expuesta a diferentes dosis de DNasa (30 min a 37°C). Las células espermáticas con el ADN fragmentado son las de halo pequeño, las sin halo y las sin halo y degradadas..... 126

Tabla 4. Fragmentación del ADN (media \pm desviación estándar), analizada utilizando los criterios de tamaños de halo obtenidos con el test SCD, y marcaje de 8-oxoG en muestras espermáticas humanas. Los espermatozoides con el ADN fragmentado muestran halos pequeños o aparecen sin halo o sin halo y degradados. Con el ensayo simultáneo del test SCD / marcaje de 8-oxoG, se puede establecer la tasa de espermatozoides con 8-oxoG en cada categoría (% de espermatozoides con 8-oxoG dentro de cada categoría)..... 128

Tabla 5. Resultados del análisis digital de imagen (media \pm desviación estándar) de 80 células espermáticas de cada tipo. El área se mide en píxeles y la intensidad media en unidades arbitrarias. ^{a, b, c, d, e}; $p < 0,05$ 141

Tabla 6. Parámetros seminales convencionales de los controles fértiles y de los pacientes con infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*..... 162

Tabla 7. Parámetros seminales convencionales de pacientes con infección genitourinaria por <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Mycoplasma sp</i> , antes y después del tratamiento con antibióticos.....	165
Tabla 8. Parámetros seminales convencionales, porcentaje de células con el ADN fragmentado y porcentaje de parejas que consiguen embarazo, durante y después del tratamiento para la infección genitourinaria por <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Mycoplasma sp</i>	167
Tabla 9. Variaciones en las tasas de embarazo en los diferentes grupos analizados. NS: estadísticamente no significativo.	174
Tabla 10. Variaciones en la fragmentación del ADN espermático en los diferentes grupos analizados. Los resultados se dan en media (\pm desviación estándar). NS: estadísticamente no significativo.....	174
Tabla 11. Análisis de regresión logística del efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre la probabilidad de obtener un embarazo o sufrir un aborto en ciclos de FIV realizados con ovocitos propios de las pacientes y en ciclos realizados con ovocitos de donantes.....	175
Tabla 12. Propiedades predictivas de la fragmentación del ADN espermático sobre la probabilidad de obtener embarazo, mediante análisis de curvas ROC. AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza.	180

Apéndice III

Curriculum vitae



Publicaciones científicas

2007 Santiso R, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Fernández JL (2007) **Evidence of modified nuclear protein matrix in human spermatozoa with fragmented deoxyribonucleic acid.** *Fertil Steril* 87(1): 191-4.

2008 Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Fernández JL (2008) **The effect of cancer on sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test.** *Fertil Steril* 90(1): 225-7.

Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL (2008) **Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*.** *Fertil Steril* 90(2): 328-34.

Fernández JL, Cartelle M, Muriel L, Santiso R, Tamayo M, Goyanes V, Gosálvez J, Bou G (2008) **DNA fragmentation in microorganisms assessed *in situ*.** *Appl Environ Microbiol* 74(19): 5925-33.

2009 Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, Remohí J, Fernández JL (2009) **Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test.** *Fertil Steril*. 92(5): 1638-45.

Santiso R, Tamayo M, Fernández JL, del Carmen Fernández M, Molina F, Villanueva R, Gosálvez J, Bou G (2009) **Rapid and simple determination of ciprofloxacin resistance in clinical strains of *Escherichia coli*.** *J Clin Microbiol* 47(8): 2593-5.

Tamayo M, Santiso R, Gosálvez J, Bou G, Fernández JL (2009) **Rapid assessment of the effect of ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli* using an *in situ* DNA fragmentation assay.** *BMC Microbiol* 9: 69.

2010 Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL (2010) **Simultaneous determination *in situ* of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm.** *Fertil Steril* 93(1): 314-8.

Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL (2010) **Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length.** *Mutat Res* 688(1-2): 88-90.

2011 Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernández JL (2011) **Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality.** *Fertil Steril* 95(1): 124-8.

Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Bou G, Fernández MC, Fernández JL (2011) **A rapid *in situ* procedure for determination of bacterial susceptibility or resistance to antibiotics that inhibit peptidoglycan biosynthesis.** *BMC Microbiol* 11: 191.

2012 Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Johnston S, Mariño A, Fernández C, Losada C, Fernández JL (2012) **DNA fragmentation dynamics allows the assessment of cryptic sperm damage in human: Evaluation of exposure to ionizing radiation, hyperthermia, acidic pH and nitric oxide.** *Mutat Res* 734(1-2): 41-9.

Tamayo M, Santiso R, Gosálvez J, Bou G, Fernández Mdel C, Fernández JL (2012) **Cell wall active antibiotics reduce chromosomal DNA fragmentation by peptidoglycan hydrolysis in *Staphylococcus aureus*.** *Arch Microbiol* 194(12): 967-75.

Bou G, Otero FM, Santiso R, Tamayo M, Fernández MD, Tomás M, Gosálvez J, Fernández JL (2012) **Fast Assessment of Resistance to Carbapenem and Ciprofloxacin of Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*.** *J Clin Microbiol* 50(11): 3609-13.

2013 Tamayo M, Santiso R, Otero F, Bou G, Lepe JA, McConnell MJ, Cisneros JM, Gosálvez J, Fernández JL (2013) **Rapid determination of colistin resistance in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* using the Micromax® assay.** *J Clin Microbiol.* 51(11):3675-82.

Capítulos de libros

- 2007 Fernández JL, Gosálvez J, Santiso R, Goyanes V, López-Fernández C. **Adaptation of the sperm chromatin dispersion (SCD) test to determine DNA fragmentation from bull sperm.** In: *New Cell Apoptosis Research*, Chap. 4, pp. 69-84. Edited by Valentino RG, Nova Science Publishers, Inc., New York. ISBN: 978-1-60021-430-1.
- 2009 Meseguer M, García-Herrero S, Vilorio T, Santiso R, Fernández JL, Garrido N. **DNA integrity and mRNA expression profile as indicators of sperm quality and assisted reproduction outcome.** In: *Human Spermatozoa: Maturation, Capacitation and Abnormalities*; Chap. 15, pp. 399-418. Edited by Lejeune T, Delvaux P, Nova Science Publishers, Inc., New York. ISBN: 978-1-60876-401-3.

Patentes

Method for evaluating bacterial cell wall integrity.

Patente Nº WO2012ES70575. Fecha de solicitud: 26/07/2012. Fecha de publicación: 31/01/2013. Estados designados: AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LI, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR. Propietario: Universidad Autónoma de Madrid. Inventores: Fernández JL, Gosálvez J, Bou G, Tamayo M, Santiso R.

Method for the rapid determination of susceptibility or resistance of bacteria to antibiotics.

Patente Nº 13382271.8 - 1405. Fecha de solicitud: 04/07/2013. Propietario: ABM Technologies, LLC. Estados designados: AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LI, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR. Inventores: Fernández JL, Gosálvez J, Santiso R, Tamayo M, Bou G.

Aportaciones a congresos

2005 **Técnica combinada SCD-FISH para el análisis simultáneo de fragmentación del ADN y aneuploidías en espermatozoides.** Muriel L, Santiso R, Gutiérrez M, Vázquez R, Segrelles E, Gosálvez J, Álvarez JG, Goyanes V, Fernández JL. III Congreso de la Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). Zaragoza (España). 17 - 18 de noviembre, 2005. **Publicado en ASEBIR. 2005, 10(2): 35. Seleccionado para comunicación oral.**

2006 **Adaptación del test de dispersión de la cromatina (SCD) para la determinación de la fragmentación del ADN en espermatozoides de toro (*Bos taurus*).** Cortés-Gutiérrez E, Santiso R, Dávila-Rodríguez MI, De la Fuente-Cortez B, Gosálvez J, Fernández JL. XXXI Congreso Nacional de Genética Humana. Chihuahua (México). 22 - 25 Noviembre, 2006. **Seleccionado para Comunicación Oral.**

Estructura del ADN del espermatozoide: presencia de sitios lábiles alcalinos en diferentes especies de mamíferos. Dávila-Rodríguez MI, Cortés-Gutiérrez E, De la Fuente-Cortez B, Santiso R, Fernández JL, Gosálvez J. XXXI Congreso Nacional de Genética Humana. Chihuahua (México). 22 - 25 Noviembre, 2006. **Seleccionado para comunicación oral.**

2007 **Daño en el ADN inducido por óxido nítrico.** Tamayo M, Santiso R, Fernández JL, Gosálvez J, Mosquera A. XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Genética (SEG). León (España). 18-21 Septiembre, 2007.

Frequency of sperm cells with fragmented DNA in males infected with *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma sp.*, determined with the sperm chromatin dispersion (SCD) test. Fernández JL, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Agarwal A, Gallegos L. 63 Congreso de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM). Washington DC (EEUU). 13-17 Octubre, 2007. **Publicado en *Fertil Steril* 88 (Suppl 1) O12, pp.S5. Seleccionado para Comunicación Oral.**

The effect of cancer on sperm DNA fragmentation measured with the sperm chromatin dispersion (SCD). Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Pellicer, J Remohí A, Fernández JL. 63 Congreso de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM). Washington DC (EEUU). 13-17 Octubre, 2007. **Publicado en *Fertil Steril* 88 (Supl 1) P692, pp.S337.**

A simple methodology for *in situ* determination of DNA fragmentation in microorganisms. Fernández JL, Cartelle M, Muriel L, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Bou G. II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007), 28 Noviembre - 1 Diciembre, 2007. Seville (Spain). **Seleccionado para Comunicación Oral.**

2008 **First determination of DNA fragmentation levels by the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test in testicular sperm samples; spermatogenesis and reproductive outcome correlations.** Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, Fernandez JL. 33rd Annual Meeting of American Society of Andrology. Albuquerque, New Mexico (EEUU). 12-15 abril, 2008. **Publicado en *J Androl. Supplement March/April 2008, p. 36.***

Estudio del daño en el ADN de espermatozoides humanos mediante el test de dispersión de la cromatina espermática (SCD), Kit Halosperm®. Ferreiro B, Fernández N, Tamayo M, Otero F, Fernández JL, Santiso R. XXI Congreso de la Asociación Española de Técnicos de Laboratorio (AETEL). Sevilla (España). 30-31 mayo, 2008

Valoración del daño genético en espermatozoides humanos mediante DNA Breakage Detection-Fluorescence *in situ* Hybridization (DBD-FISH). Sueiro R, Trillo J, Fafián ML, Santiso R, Otero F, Fernández JL, Tamayo M. XXI Congreso de la Asociación Española de Técnicos de Laboratorio (AETEL). Sevilla (España). 30-31 mayo, 2008.

The sperm chromatin dispersion (SCD) test: a simple procedure to estimate the proportion of human sperm cells with fragmented DNA. Santiso R, Tamayo M, Muriel L, Goyanes V, López I, Fernández JL. 38th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS) "Environmental mutagens and human health". Cavtat (Croacia). 21-25 septiembre, 2008. **Seleccionado para comunicación oral.**

Combined sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH evidences that human spermatozoa with fragmented DNA show an increased aneuploidy rate. Tamayo M, Santiso R, Muriel L, Goyanes V, López I, Fernández JL. 38th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS) "Environmental mutagens and human health". Cavtat (Croacia). 21-25 septiembre, 2008. **Seleccionado para Comunicación Oral.**

2009 **Association between sperm DNA fragmentation and alterations of sperm nuclear matrix.** Muriel L, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Muñoz E, Mollá M, Fernández JL. ICA 2009 Satellite Symposium "Sperm DNA Damage: from Research to Clinic. Roma (Italia). 11-13 Marzo, 2009. **Publicado en *Sys Biol Reprod Med.* 2009, 55(1): 47.**

Medida de la longitud de las secuencias teloméricas mediante PCR a tiempo real. Ferreiro B, Fernández N, Sueiro R, Trillo JA, Santiso R, Mosquera A, Tamayo M, Fernández JL. XXII Congreso de la Asociación Española de Técnicos de Laboratorio (AETEL). Mallorca (España). 29-30 de mayo, 2009.

Cuantificación de la longitud del telómero en condrocitos de cartílago con enfermedad degenerativa articular. Resultados preliminares. Tamayo M, Santiso R, Otero F, López I, Mosquera A, Rego I, Blanco FJ, Fernández JL. XXV Congreso Nacional de la Asociación Española de Genética Humana. Santiago de Compostela (España). 17-19 de junio, 2009.

Medida de la longitud media del telómero mediante PCR a tiempo real en pacientes con enfermedades reumatológicas. Mosquera A, Tamayo M, Santiso R, Otero F, López I, Rego I, Blanco FJ, Fernández-Sueiro JL, Fernández JL. XXV Congreso Nacional de la Asociación Española de Genética Humana. Santiago de Compostela (España). 17-19 de junio, 2009. **Seleccionado para comunicación oral.**

DNA fragmentation in bacteria assessed *in situ*. Santiso R, Tamayo M, Bou G, Fernández JL. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM). 39th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). 18th Annual Meeting of the Italian Environmental Mutagen Society (SIMA). Forencia (Italia). 20-25 agosto, 2009.

Assessment *in situ* of DNA double-strand breaks induced by ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli*. Tamayo M, Santiso R, Bou G, Fernández JL. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM). 39th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). 18th Annual Meeting of the Italian Environmental Mutagen Society (SIMA). Florencia (Italia). 20-25 agosto, 2009.

Rapid and simple determination of ciprofloxacin resistance in clinical strains of *Escherichia Coli*. Santiso R, Tamayo M, Fernández JL, Fernández M, Molina F, Villanueva R, Gosálvez J, Bou G. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). American Society for Microbiology. San Francisco, California (EEUU). 12-15 septiembre, 2009.

2010 **Simultaneous analysis of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm.** Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. 35th Annual Meeting of American Society of Andrology. Houston, Texas. 10-13 abril, 2010. **Publicado en *J Androl. Supplement March/April 2010, p. 67.***

Oocyte quality influences the effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy chances, as demonstrated by logistic regression analysis. Santiso R, Garrido N, Fernández JL, García-Herrero S, Vilorio T, Meseguer M. 35th Annual Meeting of American Society of Andrology. Houston, Texas (EEUU). 10-13 abril, 2010. **Publicado en *J Androl. Supplement March/April 2010*, p. 79. Trabajo ganador del premio al mejor poster (award of the American Society of Andrology).**

Sequential Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test and 8-oxoguanine labelling: simultaneous determination of DNA fragmentation and oxidative DNA damage in single sperm cells. Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. 40th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). Oslo (Noruega). 15-18 Septiembre, 2010.

A simple technique for assessing DNA fragmentation in bacteria allows a rapid assay for quinolone sensitivity or resistance. Santiso R, Tamayo M, Bou G, Fernández JL. 40th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). Oslo (Noruega). 15-18 Septiembre 2010.

Swim-up procedure selects a sperm population with longer telomere length and lower frequency of DNA fragmentation. Tamayo M, Santiso R, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. 40th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). Oslo (Noruega). 15-18 Septiembre, 2010. **Trabajo ganador del premio al mejor poster (winner of a Mutagenesis/Oxford University Press Poster Award at the European Environmental Mutagen Society meeting, Oslo, 2010).**

2011 **Oocyte quality determines the consequences of sperm DNA fragmentation on pregnancy chances.** Santiso R, Tamayo M, Meseguer M, Garrido N, García-Herrero S, Fernández JL. 41th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). Barcelona (España). 4-7 Julio, 2011. **Trabajo ganador del premio al mejor poster (winner of a Mutagenesis/Oxford University Press Poster Award at the European Environmental Mutagen Society meeting, Barcelona, 2011).**

Decreased telomere length and increased numerical chromosome aberrations in osteoarthritic chondrocytes. Tamayo M, Santiso R, Mosquera A, Rego I, Blanco JF, Gosálvez J, Fernández JL. 41th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). Barcelona (España). 4-7 Julio, 2011.

- 2012 **DNA fragmentation dynamics allows the assessment of cryptic sperm damage in human.** Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Mariño A, Fernández C, Losada C, Fernández JL. 42nd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). Varsovia (Polonia). 16-20 septiembre 2012.

Telomere length in leukocytes from carriers of mitochondrial haplogroup J: an indirect biomarker of oxidative stress. Tamayo M, Santiso R, Fernández-Moreno M, Soto-Hermida A, Mosquera A, Rego I, Oreiro N, Fernández-López C, Blanco FJ, Fernández JL. 42nd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). Varsovia (Polonia). 16-20 Septiembre 2012.

- 2013 **Rapid determination of resistance of *Acinetobacter baumannii* to colistin.** Tamayo M, Santiso R, Bou G, Lepe JA, McConnell M, Cisneros JM, Gosálvez J, Fernández JL. 9th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*. Colonia (Alemania). 19-21 junio, 2013.

Docencia

- 2009 Colaboración en la docencia de la materia “Toxicología Genética” que forma parte del **Master oficial en Biología Molecular, Celular y Genética**, implantado en el curso 2009-2010 siguiendo la normativa RD-1393/2007, verificado por ANECA en 2009 y dependiente de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña. Cursos: 2009-2010, 2010-2011, 2011-2012, 2012-2013.

Becas y contratos de investigación

- 2004 Contratada desde el 1 de junio del 2004 hasta el 31 de diciembre del 2004 por la Universidad de A Coruña a través del proyecto de investigación **“Regulación transcripcional y procesamiento de RNAs de levaduras”** (Xunta de Galicia. PGIDIT00IPXI10305PN). Trabajo desarrollado en Laboratorio de Bioquímica del departamento de biología celular y molecular de la Facultad de Ciencias de A Coruña.
- 2006 Beca concedida desde el 1 abril de 2006 hasta el 31 de marzo de 2007 por la fundación Juan Canalejo-Marítimo de Oza a través del proyecto de investigación "Diseño, desarrollo y aplicaciones de un sistema de microscopía integrado y automatizado para la valoración de la integridad del ADN de los espermatozoides humanos, como nuevo parámetro de infertilidad masculina" (Xunta de Galicia. PGIDIT04BTF916023PR). Trabajo desarrollado en el Laboratorio de Genética y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia y en el Laboratorio de Genética del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).
- 2008 Contratada desde el 15 de febrero del 2008 hasta el 31 de diciembre de 2009 por la fundación Juan Canalejo Marítimo de Oza a través del proyecto de investigación: “Desarrollo de un procedimiento simple para determinar in situ la fragmentación del ADN en bacterias. Aplicación a la evaluación rápida de la sensibilidad o resistencia a quinolonas” (Xunta de Galicia. PGIDIT07CSA050916PR). Trabajo desarrollado en el Laboratorio de Genética y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia y en el Laboratorio de Genética del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

- 2010 Contratada desde el 11 de enero de 2010 hasta el 10 enero de 2013 por el Centro Oncológico de Galicia a través del proyecto de innovación tecnológica en radiobiología: “Desarrollo de una plataforma automatizada para DBD-FISH y optimización de un test rápido de apoptosis leucocitaria y del Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test como nuevos dosímetros biológicos” (Consejo de Seguridad Nuclear (CSN) SRO/2667/2009/640). Trabajo desarrollado en el Laboratorio de Genética y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia y en el Laboratorio de Genética del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).
- 2013 Contratada por la empresa “Halotech DNA, SL” desde febrero de 2013 a través del proyecto de investigación: “Optimization of treatment with off-patent antimicrobial agents of ventilator-associated pneumonia (VAP)” (European Community. Seventh Framework Programme. Project Number 278232) (MagicBullet). Trabajo desarrollado en el Laboratorio de Genética y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia y en el Laboratorio de Genética del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

Otras becas y contratos

- 2000 Contratada en prácticas durante el período comprendido entre el 14 de julio de 2000 y el 10 de agosto de 2000 en el Aquarium Finisterrae de A Coruña.
- 2009 Beca de viaje concedida por el ICEM (International Conference on Environmental Mutagens) Fellowship Committee (William Au, Stefano Bonassi and David DeMarini) para asistir al 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 39th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), 18th Annual Meeting of the Italian Environmental Mutagen Society (SIMA), que tuvo lugar en Florencia (Italia) del 20 al 25 de agosto de 2009.

Participación en proyectos de investigación

2004 Regulación transcripcional y procesamiento de RNAs de levaduras. PGIDIT00IPXI10305PN. Xunta de Galicia. Año 2004.

Participación como becaria para colaborar con el grupo investigador.

Diseño, desarrollo y aplicaciones de un sistema de microscopía integrado y automatizado para la valoración de la integridad del ADN de los espermatozoides humanos, como nuevo parámetro de infertilidad masculina. PGIDIT04BTF916023PR. Xunta de Galicia. Años 2004-2006.

Participación como miembro contratado para colaborar con el grupo investigador.

2007 Desarrollo de un procedimiento simple para determinar in situ la fragmentación del ADN en bacterias. Aplicación a la evaluación rápida de la sensibilidad o resistencia a quinolonas. PGIDIT07CSA050916PR. Xunta de Galicia. Años 2007-2010

Participación como miembro contratado del grupo investigador.

2009 “Desarrollo de una plataforma automatizada para DBD-FISH y optimización de un test rápido de apoptosis leucocitaria y del Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test como nuevos dosímetros biológicos” SRO/2667/2009/640. Consejo de Seguridad Nuclear (CSN). Años 2009-2012.

Participación como miembro contratado del grupo de investigación.

Ayudas para la consolidación y estructuración de unidades de investigación. INCITE09E2R916144ES. Xunta de Galicia. Grupo GEDA: Año 2009.

Participación como miembro del grupo investigador.

2010 “Desarrollo de un procedimiento simple para determinar rápidamente in situ la sensibilidad o resistencia bacteriana a antibióticos que actúan sobre la pared celular”. 10CSA916020PR. Xunta de Galicia. Años 2010-2013.

Participación como miembro del grupo investigador.

Ayudas para la consolidación y estructuración de unidades de investigación. Xunta de Galicia. INCITE ES. Grupo GEDA. Año 2010.

Participación como miembro del grupo investigador.

2012 “Optimization of treatment with off-patent antimicrobial agents of ventilator-associated pneumonia (VAP)” (MagicBullet). Project Number 278232. European Community. Seventh Framework Programme. Partner: Halotech DNA, SL. Años 2012-2014.

Participación como miembro contratado del grupo de investigación.

Estancias en otros centros

2010 Breve estancia en la empresa Sexing Technologies (Navasota, Texas), bajo la supervisión del Dr. Juan Moreno, experto en citometría de flujo, para realizar estudios de investigación con la finalidad de aplicar la técnica de citometría de flujo en la valoración rápida del daño inducido por antibióticos en bacterias. Estancia financiada por Halotech DNA, SL. Octubre, 2010.

2010 Breve estancia en el laboratorio de Genética del departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la supervisión del Dr. Jaime Gosálvez, catedrático de Genética en la Universidad Autónoma de Madrid y experto en daño en el ADN, para realizar estudios de investigación con la finalidad de aplicar la técnica de citometría de flujo en la valoración rápida del daño inducido por antibióticos en bacterias. Estancia financiada por la Universidad Autónoma de Madrid. Noviembre, 2010.

2012 Breve estancia en el Laboratorio de Andrología y Embriología de la clínica CEFIVA (Oviedo), bajo la supervisión de Carlos García-Ochoa del Fresno, andrólogo, especialista en reproducción asistida humana, para realizar estudios de investigación sobre la integridad del ADN en espermatozoides y en células de la granulosa. Estancia financiada por Halotech DNA, SL. Agosto, 2012.

Apéndice IV
Artículos publicados



Evidence of modified nuclear protein matrix in human spermatozoa with fragmented deoxyribonucleic acid

Human spermatozoa were processed for determination of DNA fragmentation with use of an *in situ* diffusion assay, so that those cells containing DNA fragmentation produce extensive peripheral dissemination of DNA fragments after lysis in an agarose microgel. Quantification of specific protein staining confirmed that sperm cells without DNA fragmentation had almost complete removal of nuclear matrix proteins, whereas spermatozoa with DNA fragmentation tended to retain residual nucleoskeletal protein in a collapsed and condensed state. This result suggests that a modified nuclear protein matrix associates with fragmented sperm DNA. (Fertil Steril® 2007;87:191–4. ©2007 by American Society for Reproductive Medicine.)

The phenomenon of DNA fragmentation in sperm cells is the recent focus of dynamic research and a potential new parameter of sperm quality (1, 2). Diverse studies have demonstrated that infertile males tend to exhibit a higher proportion of spermatozoa with fragmented DNA than do fertile subjects. This also seems the case in samples with abnormal semen parameters compared with normal samples. Moreover, the determination of sperm DNA fragmentation could be of value in the assessment of the fertility potential of spermatozoa (1–4).

The mechanisms responsible for the induction of DNA fragmentation in sperm are poorly understood and could involve [1] defective spermiogenesis, caused by unrepaired DNA breaks generated during the process of chromatin remodeling (1, 3), [2] DNA damage induced by excessive levels of reactive oxygen species (5), and [3] an apoptotic DNA degradation process (1, 3, 6) resembling that observed in somatic cells. Furthermore, studies in mice lacking protamines or transition proteins, or humans with abnormal protamine 1/protamine 2 ratio, showed an increase in sperm DNA damage (7–10). This condition could make the DNA inadequately protected against reactive oxygen species and/or endonuclease attack or trigger an apoptotic-like process that degrades DNA.

Several techniques exist to analyze sperm DNA fragmentation, such as *in situ* nick translation, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling, comet assay, sperm chromatin structure assay, and the recent

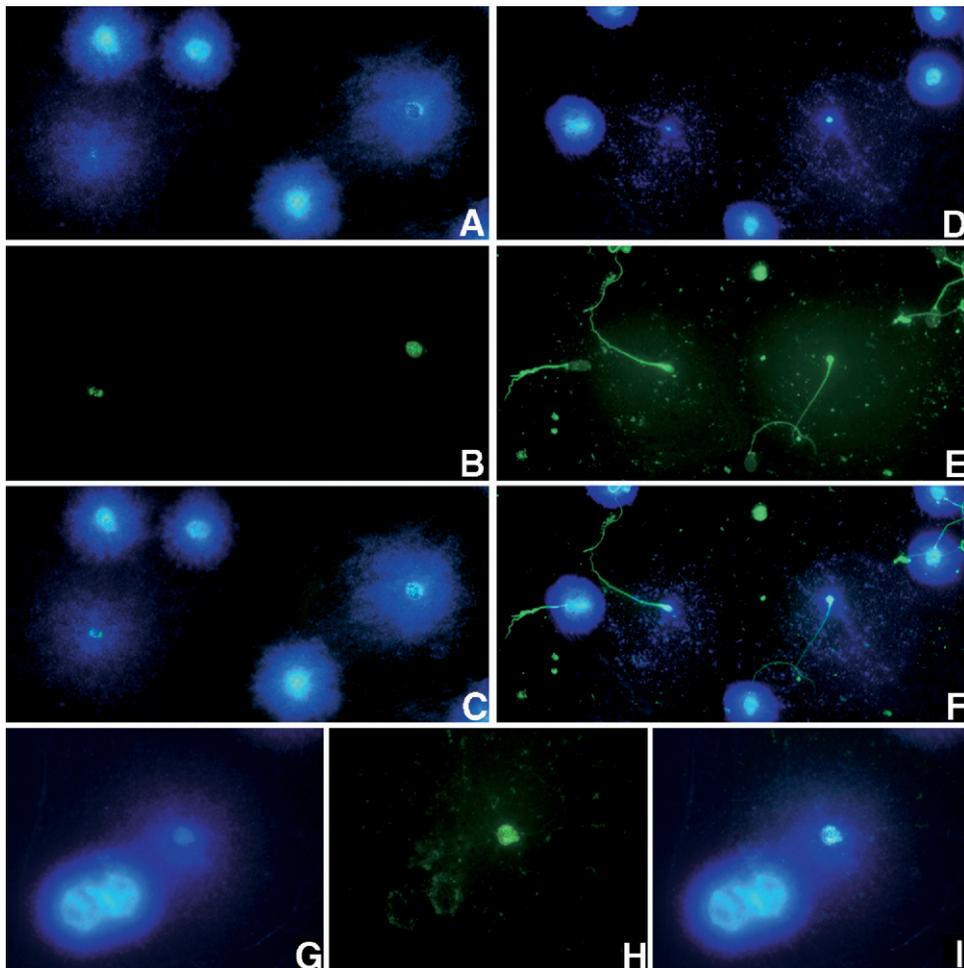
sperm chromatin dispersion test (3, 11, 12). However, the condition of the nuclear protein in the sperm cells with fragmented DNA has never been considered. It is not known whether there are differences in the nuclear protein fraction in sperm cells with or without fragmented DNA. Thus, the question is whether the phenomenon that leads to DNA fragmentation in spermatozoa also leads to modifications in the protein fraction or whether protein modification is associated with DNA fragmentation.

Human sperm cells were lysed in an inert agarose microgel, as described (6, 12). In brief, diluted spermatozoa were mixed with low-melting-point agarose to produce a final concentration of 0.7% agarose at 37°C. Twenty microliters of the mixture was pipetted onto a glass slide precoated with 0.65% standard agarose dried at 80°C, covered with a coverslip (18 × 18 mm), and left to solidify at 4°C. The coverslips were carefully removed and the slides immediately immersed horizontally in a tray with lysing solution (0.4 mol/L tris(hydroxymethyl)aminomethane, 0.4 mol/L 1,4-dithiothreitol, 1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 50 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid, pH 7.5) for 25 minutes at room temperature. The slides were washed in distilled water, dehydrated in increasing ethanol baths, and air dried. Residual protein was stained by mercuridibromofluorescein (Merck, Darmstadt, Germany) (0.05 µg/mL in phosphate-buffered saline solution), for 10 minutes. Finally, the slides were partially washed in phosphate-buffered saline solution, and the DNA was stained with 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (2 µg/mL) in Vectashield (Vector, Burlingame, CA). Images were captured with a cooled CCD KX32ME camera (Apogee Instruments, Roseville, CA), and fluorescence intensity quantified with a routine designed with Visilog 5.1 software (Noesis, Les Ulis, France). Institutional review board approval was not available for the private clinic. Pa-

Received December 22, 2005; revised and accepted May 18, 2006.
Supported by grants from the European Community (FIGH-CT-2002-00217, TELOSENS) and the Xunta de Galicia (PGIDIT 04BTF916023PR).
Reprint requests: José Luis Fernández, M.D., Sección de Genética y Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, As Xubias, 84, 15006 A Coruña, Spain (FAX: 34-981-287122; E-mail: JLFernandez@canalejo.org; genetica@cog.es).

FIGURE 1

Human sperm cells treated in microgel with a lysing solution with SDS (A–C) or without SDS (D–F). (A, D): DNA staining with DAPI (blue). (B, E): Protein staining with mercuridibromfluorescein (green). (C, F): Merge of A and B, and D and E, respectively. Staining with DAPI (A, D) shows that spermatozoa without DNA fragmentation produce halos of relaxation of DNA loops, whereas those with fragmented DNA result in big halos of diffusion of DNA fragments. Protein staining after lysing with the strong SDS-containing solution (B) shows remnant residual aggregated nuclear matrix proteins only in sperm cells with fragmented DNA. When using a softer lysing solution (E), sperm tails remain, and all spermatozoa show residual nuclear matrix proteins. Nevertheless, whereas residual matrices appear faint and homogeneous in sperm without DNA fragmentation, they are dense and aggregated in sperm with fragmented DNA. (G–I): Human granulocytes from peripheral blood treated with the lysing solution without SDS. The apoptotic cell with diffused fragmented DNA (G), retains a condensed and collapsed residual nuclear matrix (H), unlike those cells without fragmented DNA. (I): Merge of G and H.



Santis. Nuclear protein matrix in sperm with fragmented DNA. *Fertil Steril* 2007.

tients provided informed consent to use the specimen that otherwise would have been discarded.

When human sperm cells are lysed in microgel to remove membranes and proteins and stained for DNA, nuclei without DNA fragmentation show nucleoids with a central core and restricted halos of relaxed DNA loops, the latter a consequence of successful extraction of pro-

tamines (13, 14). In contrast, those nuclei containing fragmented DNA have nucleoids with remarkably large halos of chromatin diffusion spots (Fig. 1A, D). This is a typical diffusion assay for determination of DNA fragmentation (6, 15, 16).

Protein staining reveals that nuclear matrix proteins do not remain in the core from sperm nucleoids without DNA

fragmentation. Surprisingly, the sperm nucleoids with DNA fragmentation tend to retain residual nuclear matrix proteins in a collapsed and aggregated state (Fig. 1B). Different degrees of retention are observed, some with residual protein spots and some with very faint protein staining, possibly related to the level of compaction. This very distinct difference was observed when using a lysing solution containing SDS, a potent protein denaturant detergent. If the lysing solution was less aggressive, substituting SDS with 1% Triton X-100 and 2.5 mol/L NaCl, sperm cells with fragmented DNA retained even more densely aggregated residual nuclear proteins: 2× greater staining intensity was observed than with the stronger lysis buffer (Fig. 1E). But in this case, residual nuclear matrix proteins also remain in the sperm cells without DNA fragmentation, though homogeneously distributed in the core and showing a mean staining intensity 4.9× lower than those with fragmented DNA (Fig. 1E).

It must be noted that no differences in protein staining were observed in nonlysed, intact sperm cells; therefore the lysing step unmask a differential nuclear protein condition present in sperm with fragmented DNA. Acid treatment before lysis, as in the conventional sperm chromatin dispersion test, also prevented the differential response to protein removal. Lysed samples showed 8.6× lower mean protein intensity than those from nonlysed samples, providing clear indication of protein removal.

Twenty subjects were assessed, four fertile and the rest infertile, including five with normozoospermia and 11 with abnormal semen parameters, and with a range of DNA fragmentation from 5.13% to 48.0%. Virtually all the specimens tested showed the differential resistance to solubilization of nucleoskeletal protein in sperm cells with fragmented DNA, that is, with diffused DNA fragments. Sperm cells with fragmented DNA that did not retain residual nuclear protein were very scarce. The proportion of these cells varied among samples and never exceeded the 7.9% of the sperm cells with fragmented DNA. This was the highest value observed in all analyzed samples.

The nuclear matrix in mammalian spermatozoa is a network of karyoskeletal fibers, whose protein composition and structural arrangement remain to be characterized. They may include nuclear actin, myosin, cytokeratins, or spectrin, as recently described in guinea pig sperm (17). Differences exist with respect to somatic cells, because the peripheral fibrous lamina underlying the nuclear envelope, as well as the usually abundant nuclear mitotic apparatus protein, appear to be absent in spermatozoa (18). Consequently, the characterization of the nucleoskeletal modification found in sperm with fragmented DNA is a target for future research.

Qualitative chemical or enzymatic alterations may exist in some or all of the nuclear matrix proteins. Nevertheless, quantitative variations or stoichiometric imbalances cannot

be disregarded. There have been reports of protamine or transition protein deficiency in mice and humans that can lead to DNA fragmentation (7–10). However, such imbalances have never been reported for other structural nuclear proteins. An abnormal structural assembly of nucleoskeletal proteins may also be considered. Interestingly, different degrees of nuclear matrix disruption and instability have been described in lysed sperm samples from patients with cryptorchidism (19). The observations could also be explained assuming that nuclear proteins attach more avidly to damaged DNA. In that case, DNA would be more retained in the central core of the nucleoid with fragmented DNA, and the intensity of DAPI staining in the core therefore would be higher in nucleoids with fragmented than with nonfragmented DNA. Nevertheless the result was the opposite, discarding this possibility.

To induce DNA fragmentation, we incubated five sperm samples at 37°C for 48 hours. The percentage of cells with fragmented DNA increased from 10.6%, 20.6%, 26.5%, 29.4%, and 44.4%, to 54.6%, 50.5%, 55.1%, 61.9%, and 79.4%, respectively. Only those cells with fragmented DNA tended to retain the residual nuclear matrix. In all cases, the new cells added to the pool with fragmented DNA acquired this characteristic. This experiment of prolonged incubation suggests that the nuclear matrix modification may not be prior to but rather accompanies the DNA fragmentation.

It seems reasonable that the modification of the sperm nuclear matrix may be a consequence of the same mechanism that generated the DNA fragmentation. Though its tendency to collapse and condense is not visible initially in intact sperm cells, possibly as a consequence of the innate strong chromatin compaction, it is evident after protamine depletion with the lysing solution. Sperm DNA breaks could persist from those generated by topoisomerase II during chromatin remodeling in spermiogenesis (20). Because topoisomerase II is a DNA-specific enzyme and a nuclear matrix protein modification has not been described accompanying this process, this mechanism seems initially unlikely. Oxidative stress, especially if accompanied by inflammatory cytokines and proteases, may induce chemical modifications in both nuclear DNA and protein; this therefore could be another possible causal factor. Nevertheless, this stress could trigger an apoptotic-like process.

As in other cell types, what we observed might be similar to the chromatin collapse and condensation that accompanies the apoptotic DNA degradation, as a consequence of caspase-dependent proteolytic cleavage (21). In these cells, activated caspase 3 may trigger apoptosis-specific protein tyrosine phosphatases that dephosphorylate nucleoplasm and other substrates and also cleave the acinus protein, leading to apoptotic chromatin condensation. This would be associated with but independent of DNA fragmentation (22, 23). These characteristics have

not been assessed in sperm cells, but caspases, including caspase 3, may be activated in human spermatozoa (24). Supporting this hypothesis is the observation that apoptotic granulocytes also tend to retain condensed and collapsed residual nuclear matrix protein (Fig. 1G–I). This was only observed when using the lysing solution without SDS and disappeared with the stronger SDS-containing solution, evidencing a higher resistance of the sperm nucleus. In any case, our results indicate that the process that initiates DNA fragmentation in human spermatozoa also is expressed at the nuclear matrix level.

Acknowledgment: The authors thank Christopher de Jonge, Ph.D., Reproductive Medicine Center, Minnesota University, for his critical reading of the manuscript.

Rebeca Santiso, Ph.D.^a

Lourdes Muriel, Ph.D.^a

Vicente Goyanes, M.D.^{a,b}

Enrique Segrelles, M.D.^b

Jaime Gosálvez, Ph.D.^c

José Luis Fernández, M.D.^{a,b}

^a *Sección de Genética y Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, A Coruña;* ^b *ARGGORA–Unidad de la Mujer, A Coruña;* ^c *Unidad de Genética, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain*

REFERENCES

1. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9:331–45.
2. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 2005;84:850–3.
3. Evenson DP, Larson KJ, Jost LK. Sperm Chromatin Structure Assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25–43.
4. Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D. Sperm nuclear damage in the human. In: Robaire B, Hales BF, *Advances in male mediated developmental toxicity*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003:73–84.
5. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829–43.
6. Rodríguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Gosálvez J, Fernández JL. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2005;84:843–5.
7. Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 2003;111:483–8.
8. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi Y-C, Hecht NB, et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature Genet* 2001;28:82–6.
9. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, et al. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 2003;69:211–7.
10. Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JBM, Carrel DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005;26:741–8.
11. Schlegel PN, Paduch DA. Yet another test of sperm chromatin structure. *Fertil Steril* 2005;84:854–9.
12. Fernández JL, Lourdes M, Goyanes VJ, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 2005;84:833–42.
13. Tsanev R, Avramova Z. Nonprotamine nucleoprotein ultrastructures in mature ram sperm nuclei. *Eur J Cell Biol* 1981;24:139–45.
14. Rodman TC, Pruslin FH, Allfrey VG. Mechanisms of displacement of sperm basic nuclear proteins in mammals. An in vitro simulation of post-fertilization results. *J Cell Sci* 1982;53:227–44.
15. Vasquez M, Tice RR. Comparative analysis of apoptosis versus necrosis using the single cell gel (SCG) assay. *Environ Mol Mutagen* 1997;29:53.
16. Singh NP. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells [abstract]. *Exp Cell Res* 2000;256:328–37.
17. Ocampo J, Mondragón R, Roa-Espitia AL, Chiquete-Félix N, Salgado ZO, Mújica A. Actin, myosin, cytokeratins and spectrin are components of the guinea pig sperm nuclear matrix. *Tissue Cell* 2005;37:293–308.
18. Taimen P, Viljamaa M, Kallajoki M. Preferential expression of NuMA in the nuclei of proliferating cells. *Exp Cell Res* 2000;256:140–9.
19. Barone JG, Christiano AP, Ward WS. DNA organization in patients with a history of cryptorchidism. *Urology* 2000;20:1068–70.
20. Laberge R-M, Boissonneault G. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* 2005;73:289–96.
21. Martelli AM, Zwyer M, Ochs RL, Tazzari PL, Tabellini G, Narducci P, et al. Nuclear apoptotic changes: an overview. *J Cell Biol* 2001;82:634–46.
22. Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 1999;401:168–73.
23. Lu Z, Zhang C, Zai Z. Nucleoplasmin regulates chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2778–83.
24. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004;81:802–9.

The effect of cancer on sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test

The percentage of spermatozoa with fragmented DNA from cancer patients before surgery, chemotherapy, or radiotherapy treatments was compared with infertile male patients in an assisted reproduction program and with sperm donors of proven fertility. The percentages of DNA fragmentation were 34.3% in cancer patients, 30.9% in infertile men whose partners did not become pregnant, 28.8% in men whose partners became pregnant, and 10.8% in fertile sperm donors. The DNA fragmentation of sperm donors was statistically significantly lower compared to the other groups. No statistically significant differences were found in the levels of DNA fragmentation when comparing cancer types, including those of testicular origin. (Fertil Steril® 2008;90:225–7. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

Multimodal cancer therapies have greatly improved survival rates for young patients with several types of malignancies. However, cancer therapies are frequently aggressive, and side effects are common. Chemotherapy and radiotherapy adversely affect spermatogenesis, a consequence that is particularly relevant to young men who have yet to establish families. The harmful effects of chemotherapy on spermatogenesis are variable, depending on the type of chemotherapeutic agents used and their dosage. Moreover, it is not possible to predict with certainty whether spermatogenesis will return to normal after therapy (1).

A relevant but variable percentage of the cancer patients who want to freeze semen samples are already azoospermic when trying to produce ejaculates to be frozen (13% to 30%) (2). We still do not know whether tumors can cause a direct effect on testicular germ cells, and the debate is still open as to whether testicular cancers per se impair spermatogenesis.

In a previous study, our group showed the direct implications of DNA fragmentation in assisted reproduction, although this value is not correlated with pregnancy outcome in intrauterine insemination (3). We derived two interesting conclusions from the results obtained in *in vitro* fertilization (IVF) cycles. First, the determination of sperm DNA fragmentation could be of special interest for patients with low pregnancy rates and low embryonic quality as DNA damage could be a possible causal factor. Second, the observation of nucleolar asynchrony in a zygote from a sperm sample with high DNA fragmentation levels could be predictive of a future low-quality blastocyst. Also, sperm DNA fragmentation appears to be related to the ability of sperm to fertilize the oocyte (4).

Many patients were not suitable to leave frozen sperm when poor recovery of many frozen samples after thawing and intrauterine insemination were the only options. With the introduction of *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI), even the poorer samples are might be frozen with good expectations of success (5). Even so, DNA fragmentation could seriously affect the patient's fertile potential.

Our study assesses the effect of cancer on sperm, looking for a molecular marker of DNA quality. We examine the levels of DNA fragmentation in several cancer types as well as compare men with cancer with infertile patients and sperm donors of proven fertility.

MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the institutional review board of the Instituto Valenciano de Infertilidad. We analyzed male cancer patients who were referred to our unit to cryopreserve their sperm during the period January 2003 to March 2007, yielding a total of 75 men. We excluded patients who had already received some chemotherapy or radiotherapy sessions before the sperm freezing. The parameters considered with the cancer patients were age, sperm features, and type of cancer.

The mean number of sperm samples frozen per cancer patient was approximately two, and we only analyzed the first sample that was obtained (5). We selected a control group of fertile sperm donors ($n = 50$) from our sperm donation program. We also selected a group of male partners from couples who underwent infertility treatments ($n = 166$). The latter group was divided into two based on whether a pregnancy was achieved in the first assisted reproduction attempt.

All samples were obtained via masturbation following 3 to 5 days abstinence from sexual activity. After 10 minutes of liquefaction at 37°C and 5% CO₂, semen samples were examined for concentration and motility in a Mackler

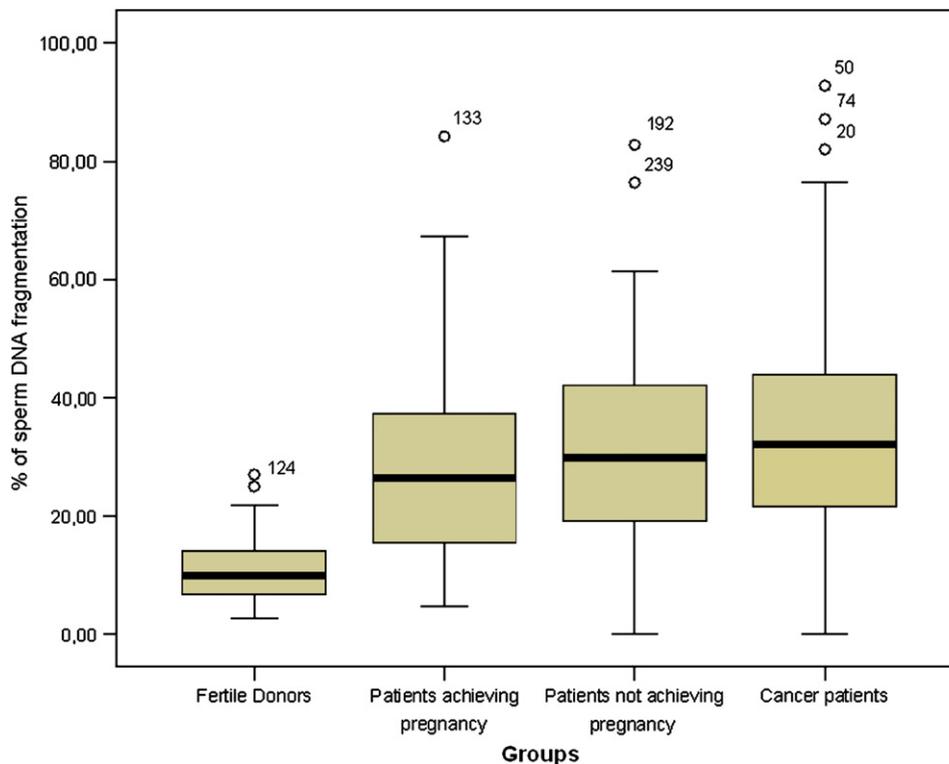
Received March 29, 2007; revised and accepted June 11, 2007.

Supported by Xunta de Galicia PGIDIT 04BTF916023PR.

Reprint requests: Marcos Meseguer, Ph.D., Instituto Valenciano de Infertilidad, Plaza de la Policía Local, 3; Valencia 46015, Spain (FAX: 34-96-305-0999; E-mail: marcos.meseguer@ivi.es).

FIGURE 1

Results of DNA fragmentation in sperm samples from fertile sperm donors, from infertile patients undergoing IVF with pregnancy on the first attempt, from IVF patients without pregnancy, and from cancer patients. The percentage of sperm cells with fragmented DNA is represented by a box plot.



Meseguer. Impact of cancer on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2008.

chamber according to World Health Organization guidelines (6). Semen samples were frozen by dropwise addition of a glycerol-based cryoprotectant with continuous shaking (Sperm Freezing Medium; Medicult Company, Jyllinge, Denmark). After a short incubation at room temperature (10 minutes), the sample was transferred drop by drop to a dry ice surface, where small holes (approximately 50 μL) had been made. Two minutes later (when the semen was completely frozen), the tablets that had formed were transferred to a cryotube immersed in liquid nitrogen, and were immediately stored in semen banks (5). Determination of DNA fragmentation was performed by the improved sperm chromatin dispersion (SCD) test, using the Halo-sperm kit (INDAS Laboratories, Madrid, Spain) and the Duo-Halamax kit (ChromaCell S.L., Madrid, Spain). The latter is a new version that includes fluorescence microscopy assessment in which sperm tails are green stained and DNA red stained. A semen aliquot (from 10 to 100 μL) was taken from each semen sample before sperm banking.

Age, sperm count ($\times 10^6$), motility (%), and volume were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Sperm DNA fragmentation were expressed as percentage of sperm cells with fragmented DNA. Statistical analysis was per-

formed using analysis of variance (ANOVA), and for multiple post hoc comparison we used the Bonferroni test. $P < .05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

We compared the levels of sperm DNA fragmentation for each cancer type diagnosed. We defined six groups: Hodgkin lymphoma ($n = 16$), non-Hodgkin lymphoma ($n = 6$), leukemia ($n = 6$), testicular tumor (nonseminoma type) ($n = 11$), seminoma ($n = 26$), and other ($n = 10$). The mean sperm DNA fragmentation in these patients was 35.8% (SEM = 2.6). There were no statistically significant differences in the sperm DNA damage levels among the six categories defined. The percentage of sperm DNA fragmentation was distributed as follows: Hodgkin lymphoma 28.08% (SEM = 5.01), non-Hodgkin lymphoma 31.50% (SEM = 5.64), leukemia 46.18% (SEM = 14.58), testicular-origin tumors, not seminomatous, 33.18% (SEM = 5.47), seminoma 34.39% (SEM = 4.08), and other 48.84% (SEM = 7.92). We have performed 30 ICSI cycles from frozen samples, with 15 pregnancies; however, this

is obviously a low number of patients to obtain adequate conclusions about the relevance of DNA fragmentation to assisted reproduction success in cancer patients.

We compared the sperm DNA fragmentation levels in the four predefined groups (Fig. 1). A progressive increase in the DNA fragmentation was observed from sperm donors to cancer patients, with the latter group having the highest represented value. Infertile patients and cancer patients had statistically significantly higher DNA fragmentation levels, and we found the levels to be comparable among infertile patients (with or without pregnancy outcome) and cancer patients.

DISCUSSION

Several reports have demonstrated that increased sperm DNA fragmentation is a consequence of chemotherapy agents, as recently described by Delbes et al. (7). Previous studies have seemed to disregard the potentially harmful effects of testicular cancer on DNA integrity (8). Thus, the benefits of sperm banking before cancer treatment can be supported by the potential of the patient becoming sterile after treatment (9) and by analyzing the rate of banked samples used.

We found no difference in the sperm DNA quality when comparing varying cancer types. In particular, in comparison with nontesticular cancer types, testicular cancer was not associated with an increased DNA fragmentation yield. Nevertheless, we cannot disregard severe stages of the illnesses in that worsened health status could affect normal sperm production.

It is interesting that the increased DNA damage we observed in cancer patients was comparable with that found in infertile patients and was statistically significantly lower than that of healthy sperm donors. In consequence, the possibility should not be overlooked that the presence of cancer (regardless of the origin) is affecting sperm quality and could be a cause of temporary infertility.

When the frozen sperm cells of cancer patients are used for an IVF cycle, good outcomes may be obtained that are comparable with those of infertile patients. In any event, it may be the only option for patients after chemotherapy, as the agents may cause temporary or permanent azoospermia (9). Our preliminary results indicate that cancer pa-

tients have higher sperm DNA fragmentation than young, healthy sperm donors and that the level of damage is similar to that found in infertile males undergoing assisted reproduction treatment. Thus, we believe that sperm freezing before treatment remains the best option for cancer patients to preserve their fertility.

Marcos Meseguer, Ph.D.^a

Rebeca Santiso, Ph.D.^{b,c}

Nicolás Garrido, Ph.D.^a

Jose Luis Fernandez, M.D.^{b,c}

^aIVI, Universidad de Valencia, Valencia; ^bSección de Genética y Unidad de Investigación, Hospital "Teresa Herrera," Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, A Coruña; and ^cCentro Oncológico de Galicia, A Coruña, Spain

REFERENCES

1. Bahadur G, Ling KL, Hart R, Ralph D, Wafa R, Ashraf A, et al. Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients. *Hum Reprod* 2002;17:3157–61.
2. Arnoldi M, Somigliana E, Paffoni A, Restelli L, Brambilla M, Ragni G. Reproductive prognosis in male cancer patients with azoospermia at the time of the diagnosis of malignancy. *Hum Reprod* 2004;(Suppl 1):i24.
3. Muriel L, Meseguer M, Fernandez JL, Alvarez J, Remohi J, Pellicer A, et al. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod* 2006;21:738–44.
4. Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ, et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006;85:371–83.
5. Meseguer M, Molina N, Garcia-Velasco JA, Remohi J, Pellicer A, Garrido N. Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year follow-up study. *Fertil Steril* 2006;85:640–5.
6. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1999.
7. Delbes G, Hales BF, Robaire B. Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *J Androl* 2007;28:241–9.
8. Stahl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Stahl E, et al. Sperm DNA integrity in testicular cancer patients. *Hum Reprod* 2006;21:3199–205.
9. Meseguer M, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Simon C, Martinez-Jabaloyas JM, et al. Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum Reprod* 2003;18:1281–5.

Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*

Guadalupe Gallegos, M.D.,^a Benito Ramos, M.D.,^a Rebeca Santiso, Ph.D.,^{b,c}
Vicente Goyanes, M.D., Ph.D.,^b Jaime Gosálvez, Ph.D.,^d and José Luis Fernández, M.D., Ph.D.^{b,c}

^a Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México; ^b Sección de Genética y Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, A Coruña; ^c Laboratorio de Genética Molecular, Centro Oncológico de Galicia, A Coruña; and ^d Unidad de Genética, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

Objective: To determine the frequency of sperm cells with fragmented DNA in semen samples from men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma* and the influence of antibiotic therapy, using the sperm chromatin dispersion test with the Halosperm kit.

Design: Prospective study.

Setting: University-affiliated reproductive medicine center, medical genetics laboratory, and academic biology center.

Patient(s): One hundred forty-three male member of couples attending the andrology infertility center and a group of 50 fertile subjects. The effect of antibiotic treatment was evaluated in 95 male patients.

Intervention(s): None.

Main Outcome Measure(s): Classical semen analysis (concentration, motility, morphology, and vitality), sperm DNA fragmentation, and clinical outcome.

Result(s): The mean percentage of sperm cells with fragmented DNA was $35.2\% \pm 13.5\%$, 3.2 times higher than in the control fertile group ($10.8\% \pm 5.6\%$). Concentration, morphology, and motility were also significantly affected but to a much lower degree. Sperm vitality was not significantly affected. After 3.8 ± 2.2 months of antibiotic treatment, the mean frequency of spermatozoa with fragmented DNA decreased from $37.7\% \pm 13.6\%$ to $24.2\% \pm 11.2\%$. Sperm concentration and motility were not significantly improved. In a group of 16 couples who attempted pregnancy during antibiotic treatment course, only 12.5% achieved pregnancy. However, in a group of 14 couples who attempted pregnancy after finishing the antibiotic treatment, 85.7% achieved it. The only significant differences found between groups was the rate of sperm DNA fragmentation and morphology.

Conclusion(s): Patients with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma* have increased sperm DNA fragmentation in comparison with fertile controls. This increase is proportionally greater than the influence on classical semen parameters and could result in a decreased fertility potential. Antibiotic therapy appears to be important in providing a remedy for infection-induced high DNA fragmentation levels. (Fertil Steril® 2008;90:328–34. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: *Chlamydia trachomatis*, mycoplasma, human sperm, sperm chromatin dispersion test, DNA fragmentation

Chlamydia trachomatis is the most prevalent sexually transmitted infectious bacterium. With nearly 90 million cases of infection annually detected worldwide, *Chlamydia* is a major cause of subfertility in both males and females (1–3). In males, *Chlamydia* is responsible for 50% of nongonococcal urethritis and the majority of postgonococcal urethritis. Furthermore, it may be associated with epididymitis and prostatitis, consequent stenosis of the duct system, and orchitis.

The influence of *Chlamydia* infection on traditional sperm parameters is not clear, and the limited studies are

Received February 6, 2007; revised June 12, 2007.

The work has been possible through a grant from the Xunta de Galicia (PGIDIT 04BTF916023PPR).

Reprint requests: Dr. José Luis Fernández, Sección de Genética y Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, As Xubias, 84, 15006-A, Coruña, Spain (FAX: 34-981-287122; E-mail: JLFernandez@canalejo.org, genetica@cog.es).

controversial. Whereas Veznik et al. (4) report a negative influence on concentration, motility, and morphology parameters, Hosseinzadeh et al. (5) did not reach the same conclusion. Moreover, Jungwirtz et al. (6) reported a slight reduction in the ability to undergo the induced acrosome reaction in sperm from *Chlamydia*-infected men. In contrast, Vigil et al. (7) detected normal sperm binding to the zona pellucida and for nuclear decondensation in the hamster-oocyte penetration assay. Finally, Idahl et al. (8) reported an association between the presence of *Chlamydia* antibodies in asymptomatic men, without any clear influence on classical semen parameters, with a reduced likelihood of achieving a pregnancy. These results call into question whether infection by *Chlamydia* may exert a more subtle and negative influence on fertility potential other than what might be revealed by evaluating traditional semen parameters.

The coexistence of two or more pathogens occurs frequently in cases of sexually transmitted diseases. In fact, the infection by *Mycoplasma* is also highly prevalent in male patients (9). However, while initial reports suggested a negative influence on seminal parameters and fertility (10–12), their potential adverse effects are unresolved (13, 14).

Co-incubation of human sperm with *Chlamydia trachomatis* or *Mycoplasma urealyticum* in vitro results in a decrease in the percentage of motile sperm and a change in plasma membrane permeability (15, 16). In addition, *Chlamydia trachomatis* may increase the frequency of spermatozoa with phosphatidylserine membrane translocation and DNA fragmentation, as determined by annexin V labeling and terminal uridine nucleotide end labeling (TUNEL) assay, respectively (17, 18). Nevertheless, a determination of the frequency of sperm cells containing fragmented DNA in sperm samples from infected males has to our knowledge not been reported.

For this investigation, semen samples from 143 infertile men with genitourinary infection were evaluated using the sperm chromatin dispersion (SCD) test. All of them were infected by *Chlamydia trachomatis*, as confirmed by direct immunofluorescence with monoclonal antibodies, and were also positive for microbiological cultures for *Mycoplasma*. The influence of antibiotic therapy on the DNA fragmentation level was also assessed in a group of 95 patients, and the outcome was reported for 30 couples who attempted pregnancy.

MATERIALS AND METHODS

Patient Selection

Approval by an Institutional Review Board could not be sought because the lack of such a review board in the private clinic. Patients provided informed consent to use their semen specimens for testing. Semen samples were collected from 143 male members of couples attending the andrology infertility clinic with diagnosed genitourinary infection from *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. The ages of the men ranged from 25 to 51 years (34.9 ± 5.4), with 5.0 ± 3.9 years of infertility. Control samples were obtained from a group of 50 fertile subjects. The effect of antibiotic therapy was evaluated in 95 male patients. The antibiotic sensitivity of *Chlamydia* is habitually similar to that of *Mycoplasma*. Then antibiotic therapy was chosen considering the antibiogram of *Mycoplasma* culture and the tolerance of the patient, including a macrolide, a tetracycline, or a quinolone, during a period depending on the evolution of symptoms and laboratory follow-up.

Semen Collection and Assessment

Semen samples were obtained by masturbation after 48–72 hours of abstinence. After liquefaction of the ejaculates, semen analysis was performed following the World Health Organization (WHO) standard guidelines (19). An aliquot from each sample was examined for sperm DNA fragmentation. The presence of *Chlamydia trachomatis* was carried out

in urethral smear or seminal pellet by direct immunofluorescence using a commercial kit (MicroTrack, Trinity Biotech, Wicklow, Ireland) according to the manufacturer's instructions. The Mycoplasma IST kit (Biomérieux, Lyon, France) was used for culture from seminal fluid. This detection method allows the quantification of the concentration of these microorganisms and their susceptibility to antibiotics.

Evaluation of DNA Fragmentation

The newly modified and improved version of the SCD test (Halosperm kit, Halotech DNA SL, Madrid, Spain) was used in this study (20). An aliquot of each semen sample was diluted to a concentration of 10 million spermatozoa/mL in phosphate-buffered saline (PBS) medium. An Eppendorf tube containing gelled low-melting-point agarose was placed in a water bath at 90–100°C for 5 minutes to melt the agarose and then in a water bath at 37°C. After 5 minutes of incubation to allow for equilibration to 37°C, 60 μ L of the diluted semen sample was added to the Eppendorf tube and mixed with the fused agarose. Aliquots of 20 μ L of the semen-agarose mixture were pipetted onto an agarose-precoated slide and covered with a 22 \times 22 mm coverslip. The slide was placed on a cold plate in the refrigerator (4°C) for 5 minutes to allow the agarose to produce a microgel with the trapped sperm cells inside.

The coverslip was gently removed, and the slide was immediately immersed horizontally in an acid solution, previously prepared by mixing 80 μ L of HCl with 10 mL of distilled water, and incubated for 7 minutes at room temperature (22°C). The slide was horizontally immersed in 10 mL of the lysing solution for 25 minutes. After washing for 5 minutes in a tray with abundant distilled water, the slide was dehydrated in increasing ethanol baths (70%, 90%, 100%) for 2 minutes each and air-dried.

For staining, the slide was horizontally covered with a mix of Wright's staining solution (Merck, Darmstadt, Germany) and PBS (Merck) (1:1) for 5–10 minutes with continuous airflow, briefly washed in tap water, and allowed to dry. Nucleoids were examined under a bright-field microscope (Leica DMRB, Wetzlar, Germany) with an immersion oil 100 \times objective.

The categorization of the different halo sizes is performed using the minor diameter of the core from the own nucleoid as a reference to which the halo width is compared (20). Five SCD patterns were established: [1] sperm cells with large halos whose width is similar or larger than the minor diameter of the core; [2] sperm cells with medium-size halos whose size is between those of large and very small halos; [3] sperm cells with very small-size halos whose width is similar to or smaller than 1/3 of the minor diameter of the core; [4] sperm cells without a halo; and [5] sperm cells without a halo degraded, which is similar to number 4 but weakly or irregularly stained. Sperm cells with very small halos, without halos, and without halo degraded contain fragmented DNA. Nucleoids that do not correspond to sperm cells were

separately scored. Five hundred spermatozoa were scored per semen sample.

Intrauterine Insemination

In a few couples, pregnancy was intended either by natural unprotected and timed intercourse, without any ovary stimulation or assisted reproduction technique, or by IUI. In this latter case, washed sperm was prepared by a dilution of semen with three to five volumes of human tubal fluid 0.5% bovine serum albumin (HTF; Irvine Scientific, Irvine, CA). The diluted semen was centrifuged at 1,200 g for 15 minutes at room temperature. The sperm pellet was resuspended in 0.5 mL HTF and selected by a swim-up technique. Ovulation was induced using clomiphene citrate, 50 mg/day, from day 5 to 10.

Statistical Analysis

All data were analyzed using the SPSS 12.0 software package for Windows (SPSS Inc., Chicago). Results are reported as mean \pm SD. Data were not normally distributed, as assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Comparison of conventional semen parameters and the different categories of halo size, according to the SCD test, from control fertile subjects and patients was carried out using the nonparametric Mann-Whitney *U*-test. The comparison of all these parameters in patients before and after therapy was performed using the Wilcoxon matched-pairs test. Correlation between conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation was assessed using the nonparametric Spearman's (*r*) test. This was also used for the assessment of the patients who intended pregnancy, with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation being compared using Pearson's χ^2 test, Fisher's exact test, or Mann-Whitney *U*-test. All hypothesis testing was two-tailed. *P* < .05 was considered statistically significant.

RESULTS

All patients (*n* = 143) infected by *Chlamydia trachomatis* were also positive for different concentrations of *Mycoplasma*. The semen parameters from the control group and in-

fectured patients are shown in Table 1. No differences were found in volume, pH, color, and viscosity. Sperm concentration, motility, and morphology were significantly affected in patients, being 1.7 \times , 1.8 \times , and 1.1 \times lower than in controls, respectively. Vitality was not significantly affected. It must be noted that, according to the WHO reference standards, 72.7% of infected patients were normozoospermic, 24.5% were classified as teratozoospermic, and all other abnormal categories were negligible. Thus, most infected patients showed normal standard semen parameters. Leukocytes were 5.2 times increased in patients relative to fertile controls. Nonetheless, all patient specimens, except one, were below the leukocytospermia threshold (1×10^6 /mL).

The SCD test demonstrated that the mean percentage of sperm cells with fragmented DNA in the patient group ($35.2\% \pm 13.5\%$) was 3.2 times higher than in the control fertile group ($10.8\% \pm 5.6\%$; Table 2). Thus, in relative terms, the DNA integrity seems the most affected parameter among those analyzed corresponding to the sperm cell. In contrast to the control group, infected patients showed a significant negative correlation between sperm DNA fragmentation and sperm concentration ($r = -0.31$; *P* < .0001), motility ($r = -0.40$; *P* < .0001), morphology ($r = -0.36$; *P* < .0001), and vitality ($r = -0.26$; *P* = .001). When the patients were separated as normozoospermic or with abnormal semen parameters, a significant difference was evident in their sperm DNA fragmentation index, that is, the frequency of spermatozoa with fragmented DNA ($33.1\% \pm 12.8\%$ vs. $40.9\% \pm 13.9\%$; Mann-Whitney *U*-test, *P* = .002). The intensity of the accompanying infection by *Mycoplasma* was not correlated with any clinical or laboratory parameter (data not shown).

A group of 95 patients was further evaluated after antibiotic and anti-inflammatory therapy (3.8 ± 2.2 months). Of the standard semen parameters, only morphology exhibited a clear improvement as a result of therapy (Table 3). The median percentage of relative improvement was 25.0%. Sperm concentration and motility were not significantly improved. The mean frequency of sperm cells with fragmented DNA decreased from $37.7\% \pm 13.6\%$ to $24.2\% \pm 11.2\%$ (Wilcoxon test, *P* < .0001), which reflects of a 35.7% improvement after therapy (Table 4). Only eight men from the group of 95 did

TABLE 1

Conventional semen parameters from control fertile subjects and patients with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*.

Samples	Concentration	Motility	Morphology	Vitality	Leukocytes
Control (<i>n</i> = 50)	$74.71 \times 10^6 \pm 33.63 \times 10^6$	73.28 ± 8.79	32.11 ± 3.68	78.46 ± 21.46	$14,285.71 \pm 35,634.83$
Patients (<i>n</i> = 143)	$44.06 \times 10^6 \pm 24.33 \times 10^6$	66.86 ± 11.41	18.15 ± 5.38	78.77 ± 20.54	$74,475.52 \pm 124,026.80$
<i>P</i>	<.001	<.010	<.001	NS	<.001

Gallegos. Sperm DNA integrity in *Chlamydia* infection. *Fertil Steril* 2008.

TABLE 2

Percentages of sperm cells with the different categories of halo size, according to the SCD test, in control fertile subjects and patients infected by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*.

Sample	Fragmentation	Big halo	Medium halo	Small halo	Without halo	Without halo degraded
Control (n = 50)	10.83 ± 5.60	72.32 ± 9.89	16.87 ± 8.36	6.68 ± 3.68	3.49 ± 2.77	0.66 ± 0.95
Patients (n = 143)	35.22 ± 13.56	43.52 ± 15.88	21.24 ± 10.67	21.30 ± 9.08	13.00 ± 9.89	0.94 ± 1.41
P	<.001	<.001	<.05	<.001	<.001	NS

Note: The frequency of spermatozoa with fragmented DNA corresponds to the count of those with small halo, without halo, and without halo and degraded.

Gallegos. Sperm DNA integrity in Chlamydia infection. Fertil Steril 2008.

not have a significant change in the frequency of sperm cells with fragmented DNA, and one had worsened frequency. Thus, the sperm DNA fragmentation was the parameter that showed the greatest relative post-therapy improvement. No semen parameter ever reached the values of the control group.

The post-therapy follow-up was irregular among patients, either in interval of time between sampling or in numbers of samplings. Nevertheless, when dividing post-therapy time in groups of months, it was evident that the improvement was more pronounced after the first 3 months after treatment. This outcome was the same for morphology and for the frequency of sperm cells with DNA fragmentation.

Fertility outcome could be preliminarily determined in a group of 30 patients. Pregnancy was achieved in only 12.5% of couples who tried it during the course of antibiotic treatment (6 weeks minimum; n = 16). Otherwise, it was successful in 85.7% of couples that attempted pregnancy 3–6 months after therapy (n = 14; r = 0.73, P < .0001; χ^2 test, P < .0001). Seven couples achieved pregnancy spontaneously, without any ovary stimulation or assisted reproduction technique, and five achieved pregnancy after IUI. When comparing both groups, no differences were evident in concentration

($39.19 \times 10^6 \pm 17.99 \times 10^6$ vs. $54.67 \times 10^6 \pm 26.67 \times 10^6$; P = .09), motility (63.44 ± 17.20 vs. 69.14 ± 7.67 ; P = .47), or vitality (78.75 ± 10.12 vs. 81.07 ± 3.73 ; P = .85). Only the frequency of sperm cells with fragmented DNA was found to be significantly different ($43.3\% \pm 14.1\%$ vs. $32.2\% \pm 7.6\%$; Mann-Whitney U-test, P = .047), as well as for normal sperm morphology ($16.0\% \pm 3.8\%$ vs. $18.8\% \pm 3.3\%$; Mann-Whitney U-test, P = .040). Thus, the decrease in frequency of spermatozoa with fragmented DNA, as a consequence of therapy, may be relevant to improve the pregnancy rates in patients with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*.

DISCUSSION

In vitro co-incubation of *Chlamydia trachomatis* with spermatozoa has been reported to cause a decrease in the percentage of motile sperm as well as an increase in the proportion of dead sperm as determined by the hypoosmotic swelling test (15), which could be related to an increase in tyrosine phosphorylation of sperm proteins (21). Moreover, these effects were found to be mainly caused by the lipopolysaccharide purified from the bacteria, as also demonstrated by co-incubation in vitro with the lipopolysaccharide (22). The present study mainly focused on determining whether in vivo

TABLE 3

Conventional semen parameters from patients with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*, before and after therapy.

Sample (n = 95)	Concentration	Motility	Morphology	Vitality	Leukocytes
Before treatment	$43.67 \times 10^6 \pm 22.16 \times 10^6$	66.96 ± 10.32	17.14 ± 4.50	79.59 ± 9.50	$67,368.42 \pm 75,360.28$
After treatment	$44.85 \times 10^6 \pm 20.71 \times 10^6$	68.39 ± 9.23	23.17 ± 4.83	79.65 ± 11.32	$68,947.37 \pm 137,062.45$
P	NS	NS	<.001	NS	NS

Gallegos. Sperm DNA integrity in Chlamydia infection. Fertil Steril 2008.

TABLE 4

Percentages of sperm cells with the different categories of halo size, according to the SCD test, in patients infected by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*, before and after treatment.

Sample (n = 95)	Fragmentation	Big halo	Medium halo	Small halo	Without halo	Without halo degraded
Before treatment	37.67 ± 13.60	40.15 ± 14.74	22.17 ± 10.41	23.04 ± 9.02	13.46 ± 9.78	1.18 ± 1.59
After treatment	24.22 ± 11.18	51.63 ± 14.24	24.09 ± 10.10	16.37 ± 7.28	7.39 ± 6.28	0.46 ± 0.87
P	<.001	<.001	<.05	<.001	<.001	<.001

Note: The frequency of spermatozoa with fragmented DNA corresponds to the count of those with small halo, without halo, and without halo and degraded.

Gallegos. Sperm DNA integrity in Chlamydia infection. Fertil Steril 2008.

Chlamydia trachomatis and *Mycoplasma* infection affects the DNA integrity of spermatozoa, as well as the influence of antibiotic therapy on DNA integrity and traditional semen parameters.

The effects of *Chlamydia* infection in vivo on the standard semen parameters from infected male patients are controversial. Veznik et al. (4) reported an overall negative influence of infection on ejaculate volume, sperm concentration, motility, velocity, and morphology. In contrast, Hosseinzadeh et al. (5) did not find any clear negative impact on semen parameters, but they did find a negative impact on asymptomatic patients. Our results are somewhat in agreement with results from both studies. Standard semen parameters were found to be significantly affected with respect to those of control fertile subjects, but to a slight extent, and most values fell within the WHO semen parameter reference range. Thus, the possible influence on male factor fertility due to *Chlamydia* infection, as confirmed by Idahl et al. (8), seems not to be mediated through the alterations in concentration, motility, morphology, and vitality of spermatozoa.

Eley et al. (17) co-incubated highly motile spermatozoa with extracted lipopolysaccharide from *Chlamydia trachomatis* and reported an increase in the percentage of apoptotic spermatozoa from 5% in the control to 25% in the treated group. Apoptotic sperm were considered those that translocated phosphatidylserine to the outer membrane, that is, those binding annexin V and unstained using propidium iodide (PI). Nevertheless, a high percentage of both annexin V- and PI-positive (necrotic) cells were also detected. Other evidence of induced apoptosis was the detection of increased oligonucleosomal DNA and histones in sperm cell lysates and an increased caspase activity, especially from caspase 3. Although widely used, the annexin V binding as well as caspase activity determination are not clearly indicative of apoptotic DNA degradation in sperm cells. In fact, capacitation also triggers the scrambling of phosphatidylserine (23), and the presence of typical apoptotic markers, for example, annexin V, Fas, Bcl-x, or p53, is not strictly a sign of the presence of DNA fragmentation (24, 25). Moreover, since human spermatozoa normally contain a very reduced amount of histones, their determination in cell lysates may be indicative of DNA damage

or disturbed exchange of histones by protamines, that is, disturbed chromatin condensation, but perhaps not necessarily of massive apoptotic DNA fragmentation. In any case, based on the present data, human sperm DNA is susceptible to damage as a result of bacterial infection.

Recently, Satta et al. (18) co-incubated motile sperm with elementary bodies of *Chlamydia trachomatis*. A significant increase in annexin V-positive cells occurred only after 24 hours and with relatively high concentrations of the microorganism. In this study, the percentage of sperm cells with fragmented DNA was measured with the TUNEL assay, and a significant increase in fragmentation was detected after 6 hours of incubation. Our study, using the SCD test, demonstrated that there is a 3.2 mean higher frequency of sperm cells with fragmented DNA than in control fertile subjects, and this was the most relatively affected semen parameter. This increase is not different from that found in other infertile patients described in other reports and using the same technique (26). Unlike in the group of control fertile subjects, in the case of the infected patients, the greater the DNA fragmentation, the higher the decrease in concentration, motility, morphology, and vitality. This suggests that the normal background frequencies of sperm DNA fragmentation are independent of the other seminal parameters. Nevertheless, the correlations between the sperm DNA fragmentation and the changes in the other seminal parameters in the infected patients could be attributable to the infection.

Despite the fact that the in vitro co-incubation studies previously described clearly demonstrated a direct role of *Chlamydia trachomatis* in the induction of DNA fragmentation in sperm cells, the origin of DNA fragmentation in vivo could be more complex. The inflammatory reaction, either acute or chronic, in the male genital tract may result in oxidative stress by overproduction of reactive oxygen species (ROS). They may directly damage sperm DNA or induce an apoptotic-like response that results in DNA fragmentation (27, 28).

Leukocytes may release ROS or may stimulate its production by the spermatozoa. In our study, although seminal leukocytes were 5.2-fold increased in infected patients, they

were below the leukocytospermia threshold given by the WHO. Nevertheless, their influence in the production of abnormal ROS levels could be relevant, especially when chronically present. In fact, Henkel et al. (29) suggested that the threshold of $1 \times 10^6/\text{mL}$ should be re-evaluated because lower leukocyte counts can compromise DNA integrity. The chlamydial lipopolysaccharide could affect the sperm cell through the induction of excessive ROS production by the spermatozoa, thus enhancing the oxidative stress (30). Finally, the simultaneous infection with *Mycoplasma* could interact with *Chlamydia* in the sperm injury. In fact, seminal ROS levels may be elevated among patients with *Ureaplasma urealyticum* (31), and in vitro incubation with this microbe seems to affect motility and membrane permeability of sperm cells (16).

Antibiotic therapy was successful in decreasing the percentage of spermatozoa with fragmented DNA and, in a small group, was found to improve pregnancy rates. This result confirms the influence of the infection on the DNA integrity of human sperm. Furthermore, it suggests that the improvement in DNA integrity from sperm cells after therapy could be a relevant factor for achieving pregnancy. Moreover, it could be a useful parameter to monitor the effectiveness of the therapy. More extensive work should be done to confirm these findings.

Recently, the polymorphic membrane protein D was recognized as an important factor in the infection process by *Chlamydia trachomatis* (32). Furthermore, it was proposed as an interesting target for a possible future vaccine. If successful, it would be interesting to analyze its influence on sperm quality and especially on sperm DNA integrity, both in vitro and in vivo. Overall, our results suggest a potential role of sperm DNA damage, more significant than the injury to other seminal parameters, in possible infertility due to *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma* genitourinary infection.

Acknowledgment: We are very grateful to Professor Christopher de Jonge from the Reproductive Medicine Center, Minnesota University, for a critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. Hum Reprod Update 1999;5:433–47.
2. World Health Organization. In: Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Geneva: World Health Organization, 2001:1–43.
3. González GF, Muñoz G, Sánchez R, Henkel R, Gallegos-Avila G, Diaz-Gutierrez O, et al. Update on the impact of Chlamydia trachomatis infection on male infertility. Andrologia 2004;36:1–23.
4. Veznik Z, Pospisil L, Svecova D, Zajicova A, Unzeitig V. Chlamydiae in the ejaculate: their influence in the quality and morphology of the sperm. Acta Obstet Gynecol Scand 2004;83:656–60.
5. Hosseinzadeh S, Eley A, Pacey AA. Semen quality of men with asymptomatic chlamydial infection. J Androl 2004;25:104–9.
6. Jungwirth A, Straberger B, Esterbauer K, Fink K, Schmeller N. Acro-some reaction in chlamydia-positive and negative patients. Andrologia 2003;35:314–6.

7. Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM. Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. Andrologia 2002;34:155–61.
8. Idahl A, Boman J, Kumlin U, Olofsson JI. Demonstration of Chlamydia trachomatis IgG antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduced likelihood of achieving a pregnancy. Hum Reprod 2004;19:1121–6.
9. Kilic D, Basar MM, Kaygusuz S, Yilmaz E, Basar H, Batislam E. Prevalence and treatment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, and Mycoplasma hominis in patients with non-gonococcal urethritis. Jpn J Infect Dis 2004;57:17–20.
10. Gnärpe H, Friberg J. Mycoplasma and human reproductive failure. I. The occurrence of different Mycoplasma in couples with reproductive failure. Am J Obstet Gynecol 1972;114:727–31.
11. Gnärpe H, Friberg J. T-mycoplasmas on spermatozoa and infertility. Nature 1973;245:97–8.
12. Fowlkes DM, MacLeod J, O'Leary WM. T-Mycoplasmas and human infertility: correlation of infection with alterations in seminal parameters. Fertil Steril 1975;26:1212–8.
13. De Louvois J, Beader M, Harrison RF, Hurley R, Stanley VC. Frequency of Mycoplasma in fertile and infertile couples. Lancet 1974;1:1073–5.
14. Andrade-Rocha FT. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. Urol Int 2003;71:377–81.
15. Hosseinzadeh S, Brewis IA, Eley A, Pacey AA. Co-incubation of human spermatozoa with Chlamydia trachomatis serovar E causes premature sperm death. Hum Reprod 2001;16:293–9.
16. Nuñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, Meseguer MA. Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. Hum Reprod 1998;13:2756–61.
17. Eley A, Hosseinzadeh S, Hakimi H, Geary I, Pacey AA. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with Chlamydia trachomatis lipopolysaccharide. Hum Reprod 2005;20:2601–7.
18. Satta A, Stivala A, Garozzo A, Morello A, Perdichizzi A, Vicari E, et al. Experimental Chlamydia trachomatis infection causes apoptosis in human sperm. Hum Reprod 2006;21:134–7.
19. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Geneva: World Health Organization, 1999.
20. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. Fertil Steril 2005;84:833–42.
21. Hosseinzadeh S, Brewis IA, Pacey AA, Moore HDM, Eley A. Co-incubation of human spermatozoa with Chlamydia trachomatis in vitro causes increased tyrosine phosphorylation of sperm proteins. Infect Immun 2000;68:4872–6.
22. Hosseinzadeh S, Pacey AA, Eley A. Chlamydia trachomatis induced death in human spermatozoa is caused primarily by lipopolysaccharide. J Med Microbiol 2003;52:193–200.
23. De Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. Biol Reprod 2003;68:2122–34.
24. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. Biol Reprod 2002;66:1061–7.
25. Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D. Sperm nuclear damage in the human. In: Robaire B, Hales BF, eds. Advances in male mediated developmental toxicity. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003:73–84.
26. Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test. J Androl 2006;27:106–11.
27. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1998;59:1037–46.

28. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004;19:129–38.
29. Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 2005;83:635–42.
30. Eley A, Pacey AA, Galdiero M, Galdiero M, Galdiero F. Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm? *Lancet* 2005;5:53–7.
31. Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A. Association of ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *J Urol* 2000;163:1775–8.
32. Crane D, Carlson J, Fischer E, Bavoi P, Hsia R, Tan C, et al. Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen. *PNAS* 2006;103:1894–9.

Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm

Deoxyribonucleic acid fragmentation and oxidative DNA damage were simultaneously determined in the same sperm cell, incubating with an 8-oxoguanine DNA probe on human spermatozoa processed by the sperm chromatin dispersion test. The assay was validated by incubation with agents that induce DNA fragmentation with or without oxidative base damage. In all samples examined, increased levels of 8-oxoguanine were present only in those spermatozoa with fragmented DNA, suggesting a link between both DNA damage types. (Fertil Steril® 2010;93:314–8. ©2010 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Sperm chromatin dispersion test, SCD, DNA fragmentation, DNA damage, oxidative DNA damage, 8-oxoguanine, reactive oxygen species

Determination of sperm DNA fragmentation is a marker of sperm quality and a potential fertility predictor. Sperm DNA fragmentation could be the result of unrepaired DNA breaks produced during the process of chromatin remodeling in spermiogenesis, an apoptotic-like DNA degradation process, or induced by oxidative stress, when reactive oxygen species (ROS) generation overcomes the ROS antioxidant-scavenging activities (1, 2). High levels of ROS can be released by activated leukocytes and/or macrophages, by the cytoplasmic drop associated with immature sperm cells, or during comigration from the seminiferous tubules to the epididymis (1, 2).

A relatively frequent oxidative modification of DNA is the hydroxylation of guanine at C-8, forming 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxoG), a well-recognized marker of DNA oxidative damage (3). Recently, 8-oxoG has been determined in human sperm samples using a specific fluorescent probe. Quanti-

fication of the frequency of spermatozoa with 8-oxoG demonstrated an association with decreased sperm motility and lower embryo quality after IVF or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (4).

We have applied the 8-oxoG probe in sperm cells previously processed for determination of sperm DNA fragmentation by the sperm chromatin dispersion (SCD) test, with the Halosperm kit (Halotech-DNA SL, Madrid, Spain) (5). Using this technique, sperm nuclei with DNA fragmentation show small halos or no halos of DNA dispersion, whereas those sperm without DNA fragmentation release their DNA loops, forming large halos emerging from the core. Subsequent application of the fluorescent 8-oxoG probe from the OxiDNA assay kit (Calbiochem, Barcelona, Spain) allowed the simultaneous determination of DNA fragmentation and oxidative base damage on the same sperm cell.

To validate the assay, in vitro incubation of a sample from a fertile donor with agents that produce DNA fragmentation with or without oxidative DNA base damage was performed (Table 1). In the control untreated cells, those background cells with fragmented DNA were strongly labeled by the 8-oxoG probe (Table 1; Fig. 1A and B), showing a mean fluorescence intensity of 112.2 ± 54.7 arbitrary units; this was 4.7-fold higher than the background signal from spermatozoa without fragmented DNA (23.9 ± 16.4).

Aliquots of the sperm sample were treated with hydrogen peroxide (H_2O_2), which decomposes into hydroxyl radicals (OH), which in turn act as strong ROS. OH attack on the deoxyribose moiety can lead to strand breaks with various sugar modifications and abasic sites (6). Moreover, OH also produces a wide spectrum of oxidative base alterations, especially 8-oxoG (6). Thus, incubation with H_2O_2 should produce both DNA fragmentation and 8-oxoG in the same sperm cell and this was the result obtained (Table 1). The intensity of 8-oxoG labeling was similar to that from spermatozoa with fragmented DNA from control untreated cells (143.7 ± 91.4). This labeling was strongest at the highest dose applied (5 mM), achieving 269.9 ± 123.0 (Fig. 1C and D).

Other aliquots were exposed to sodium nitroprusside (SNP); it decomposes to produce nitric oxide (NO), which is unstable in

Rebeca Santiso, Ph.D.^a

María Tamayo, Ph.D.^a

Jaime Gosálvez, Ph.D.^b

Marcos Meseguer, Ph.D.^c

Nicolás Garrido, Ph.D.^c

José Luis Fernández, M.D., Ph.D.^a

^a INIBIC—Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Unidad de Genética, Coruña, Spain

^b Unidad de Genética, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

^c IVI Valencia, Universidad de Valencia, Spain

Received April 29, 2009; revised June 15, 2009; accepted July 2, 2009; published online September 11, 2009.

Supported by a grant from the Xunta de Galicia (PGIDIT 04BTF916023PR).

R.S. has nothing to disclose. M.T. has nothing to disclose. J.G. has nothing to disclose. M.M. has nothing to disclose. N.G. has nothing to disclose. J.L.F. has nothing to disclose.

Reprint requests: José Luis Fernández, M.D., Ph.D., Sección de Genética y Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, As Xubias, 84, 15006- A Coruña, Spain (TEL: 34 981 287499; FAX: 34 981 287122; E-mail: Jose.Luis.Fernandez.Garcia@sergas.es, joseluis.fernandez@cog.es).

TABLE 1

Percentages of the different halo sizes obtained by the SCD test in a sperm sample exposed to different doses of H₂O₂ (60 minutes at 37°C), SNP (60 minutes at 37°C), and DNAaseI (30 minutes at 37°C). Sperm cells containing fragmented DNA are those with small halo, without halo, and without halo and degraded.

Treatment		Big halo	Medium halo	Small halo	Without halo	Without halo and degraded	Fragmentation
Control		85.0	1.5	2.0	10.0	1.5	13.5
H ₂ O ₂	0.5 mM	8.1	15.8	37.8	36.6	1.7	76.1
	1 mM	0.0	0.0	5.4	92.1	2.5	100.0
	2 mM	0.0	0.0	0.0	97.2	2.8	100.0
	5 mM	0.0	0.0	0.0	94.5	5.5	100.0
	50 mM	0.0	0.0	0.0	86.7	8.7	100.0
SNP	5 mM	60.8	4.6	4.6	21.6	8.3	34.5
	10 mM	42.0	8.5	8.1	35.7	5.6	49.4
	25 mM	4.2	13.5	31.5	45.8	4.9	82.2
	50 mM	0.0	0.0	32.2	66.4	1.4	100.0
DNAaseI	0.5 U	0.0	24.3	47.0	28.7	1.0	76.7
	1 U	0.0	3.0	46.7	47.0	3.3	97.0
	2.5 U	0.0	0.0	4.7	86.7	8.7	100.0

Santiso. Correspondence. Fertil Steril 2010.

the presence of molecular oxygen and forms nitrous anhydride (N₂O₃), which causes nitrosative stress. Otherwise, NO also reacts with superoxide anion (O₂⁻), to yield peroxynitrite (ONOO⁻), a strong oxidizing agent. Overall, through N₂O₃ and ONOO⁻, NO released by SNP can induce mainly DNA breaks and abasic sites in DNA, and predominately lesions in guanine residues (7). 8-Nitroguanine is formed by NO at 100- to 1,000-fold greater amounts than 8-oxoG (8). As a result, and unlike H₂O₂ treatment, spermatozoa incubated with SNP should show DNA fragmentation, but with limited 8-oxoG production. Spermatozoa appeared with a small or no halo and with relative faint 8-oxoG labeling after a high SNP dose. Incubations with rising doses of the NO donor SNP resulted in a subsequent increase in the frequency of spermatozoa with fragmented DNA (Table 1). Unlike H₂O₂, most of the strongly labeled cells with the 8-oxoG probe were those containing DNA fragmentation existing before SNP treatment. Only very high SNP doses (50 mM) resulted in a significant albeit faint increase in 8-oxoG labeling (42.1 ± 13.3 arbitrary units) in those cells containing DNA fragmentation (Fig. 1E and F).

After permeabilization, the sperm were incubated with bovine pancreatic deoxyribonuclease (DNAaseI). This treatment produced DNA fragmentation (Table 1), but without any increase in 8-oxoG labeling (14.9 ± 12.8 arbitrary units; Fig. 1G and H); it was expected because the DNA chain breakage is enzymatically produced and not through oxidative damage. The results of the in vitro incubations are in accordance with those expected, thus validating the technical procedure.

Result from DNAaseI incubation suggests the possibility of DNA fragmentation in the absence of oxidative base damage. Nevertheless, the sample demonstrated that the background cells with fragmented DNA were also enriched in 8-oxoG. To gain insight into this, a group of 31 sperm samples were processed for DNA fragmentation and 8-oxoG labelling (Table 2): ten were normozoospermic, eight teratozoospermic, two oligozoospermic, eight asthenoteratozoospermic, and three oligoasthenoteratozoospermic, according to the World Health Organization guidelines.

Institutional review board approval was not available for the private clinic. Patients provided informed consent to use the specimens that otherwise would have been discarded.

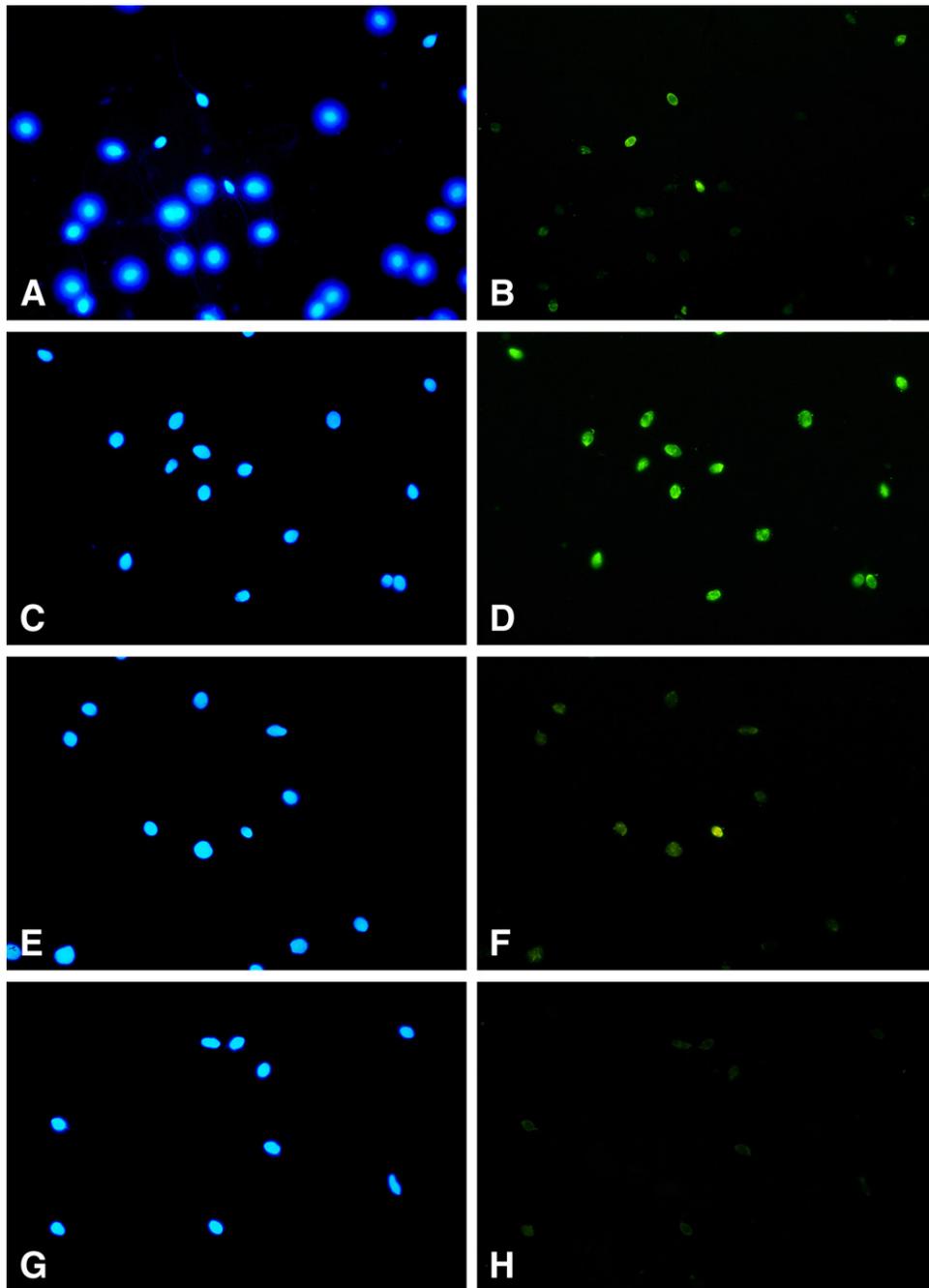
The frequency of spermatozoa showing 8-oxoG labeling was not significantly different to that of DNA fragmentation. In fact, the 8-oxoG signal was virtually restricted to the population of spermatozoa containing fragmented DNA. Practically all of those nucleoids without halo were labeled (Table 2). Approximately 23% of spermatozoa showing a medium-size halo exhibited 8-oxoG labeling, despite the absence of DNA fragmentation. Nevertheless, this finding had minimal relevance because sperm cells showing this halo size are scarce.

Certain studies have suggested that when the semen sample contains ≥ 30% of sperm cells with fragmented DNA, the probability of achieving a viable pregnancy is low. This finding suggests that the sperm population without fragmented DNA might also contain some kind of DNA damage not compatible with a viable pregnancy (i.e., DNA fragmentation being the tip of an “iceberg effect”) (9). Oxidative DNA base damage has been suggested as responsible for this iceberg effect (10). This hypothesis was tested in a selected group of 20 patients with 30.9–59.0% of sperm cells with fragmented DNA, nine of them giving pregnancy after ICSI and eleven not. The first group showed a percentage of sperm cells with fragmented DNA of 36.5 ± 5.0 and the second group revealed 44.9 ± 11.6. No statistical differences were detected, but the *P* value approached significance (Student's *t* test, *P* = 0.086). The pregnancy group had an 8-oxoG labeling frequency of 31.8 ± 8.4 (range, 13.4–42.8), whereas it was 40.6 ± 11.5 (range, 27.4–60.3) in the population that did not achieve pregnancy (*P*=0.114). The 8-oxoG was mostly detected in those sperm cells with fragmented DNA (Fig. 2), and no significant differences were found between samples that gave pregnancy or not.

This result initially discards an extensive ROS damage outside the sperm cells with fragmented DNA. Nevertheless, the possibility exists for the presence of DNA lesions other than 8-oxoG in the spermatozoa without DNA fragmentation; this could be the case

FIGURE 1

Sperm DNA fragmentation, assessed by the SCD test (*left*, DAPI staining blue), followed by sequential detection of 8-oxoG (*right*, FITC labeling green). Sperm cells from a fertile normozoospermic sample were incubated with agents that induce DNA fragmentation. For illustrative purposes, images were chosen from doses that induced DNA fragmentation in the entire sperm population (i.e., without halo). **(A and B)** Control untreated sample. Only those spermatozoa with fragmented DNA appear labeled with the 8-oxoG probe. **(C and D)** H₂O₂ (5 mM). All of the sperm cells with fragmented DNA show a strong 8-oxoG labeling. **(E and F)** SNP (50 mM). Only one sperm cell has abundant 8-oxoG. The other spermatozoa containing DNA fragmentation exhibit only a weak 8-oxoG labeling. **(G and H)** DNAaseI (2.5 units). All of the spermatozoa appear with merely background signal from the 8-oxoG probe.



Santiso. Correspondence. *Fertil Steril* 2010.

TABLE 2

Deoxyribonucleic acid fragmentation (mean \pm SD), analyzed with the criteria of halo sizes obtained with the SCD test, and 8-oxoG labeling in human sperm samples. Spermatozoa with fragmented DNA show small halos or appear without halo or without halo and degraded. The 8-oxoG sperm rate in each category of halo size can be established with the sequential in situ SCD test/8-oxoG labeling.

n = 31	% Sperm	% 8-oxoG sperm	8-oxoG sperm rate
Big halo	67.73 (\pm 13.59)	0.34 (\pm 0.61)	0.61 (\pm 1.07)
Medium halo	2.45 (\pm 1.75)	0.55 (\pm 0.68)	22.99 (\pm 20.88)
Small halo	7.63 (\pm 3.59)	6.16 (\pm 3.64)	82.23 (\pm 24.12)
Without halo	13.69 (\pm 7.23)	13.31 (\pm 7.11)	97.58 (\pm 6.33)
Degraded	8.50 (\pm 6.39)	6.23 (\pm 5.87)	71.44 (\pm 20.60)
Fragmented	29.82 (\pm 12.74)	25.71 (\pm 11.55)	86.58 (\pm 10.72)
Not fragmented	70.18 (\pm 12.74)	0.89 (\pm 1.16)	1.45 (\pm 2.07)

Santiso. Correspondence. Fertil Steril 2010.

with NO-induced DNA lesions (7, 8). For example, in varicocele, NO could be released by the endothelial cells from the dilated veins, leading to oxidative damage (11). Nevertheless, attack of NO-derived radicals might produce isolated base damages or be accompanied by DNA breakage (12).

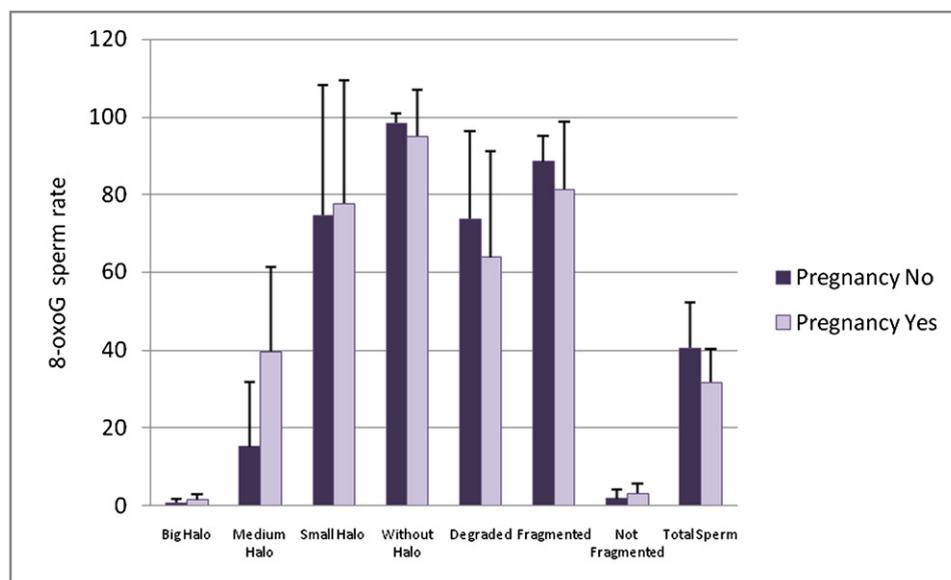
The present results suggest a link between DNA fragmentation and oxidative base damage, pointing to an ROS attack on DNA. Nevertheless, cytochrome *c* release from mitochondria, which triggers caspase activation, appears to be largely mediated by direct or indirect ROS action (13). Therefore, DNA fragmentation could be a direct expression of ROS-induced

damage shared with activated nuclease activity through an apoptotic process triggered by the ROS overproduction (14). However, it cannot be discounted that the association of ROS-induced base damage with DNA fragmentation could arise as a consequence of retention of DNA breaks produced during spermiogenesis. The technical procedure to assess oxidative base damage combined with sperm DNA fragmentation might be an interesting tool to explore the origins of alterations of sperm DNA integrity.

Acknowledgments: We are grateful to Christopher de Jonge, Reproductive Medicine Center, Minnesota University, for his critical reading.

FIGURE 2

Frequencies of 8-oxoG labeling in the different categories of halo sizes from the SCD test (8-oxoG sperm rate) in samples that achieved pregnancy and samples that did not, after ICSI. *Total sperm* corresponds to the frequency of 8-oxoG labeling independently of DNA fragmentation.



Santiso. Correspondence. Fertil Steril 2010.

REFERENCES

1. Fernández JL, Vélez de la Calle JF, Tamayo M, Cajjal D, Agarwal A, Gosálvez J. Sperm DNA integrity and male infertility: current perspectives. *Arch Med Sci*. In press.
2. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79: 829–43.
3. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387:147–63.
4. Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril* 2008;89:1191–9.
5. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 2005;84:833–42.
6. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 1995;18:1033–77.
7. Burney S, Caulfield JL, Niles C, Whishnok JS, Tannenbaum SR. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res* 1999;424:37–49.
8. Szabó C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1997;1:373–85.
9. Evenson DP, Larson KJ, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23: 25–43.
10. Alvarez JG. The predictive value of sperm chromatin structure assay. *Hum Reprod* 2005;20: 2365–7.
11. Mitropoulos D, Deliconstantinos G, Zervas A, Villiotou V, Dimopoulos C, Stavrides J. Nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities in the spermatic vein of patients with varicocele: a potential role for nitric oxide and peroxynitrite in sperm dysfunction. *J Urol* 1996;156:1952–8.
12. Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *J Androl* 2006;27:106–11.
13. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 2005;122:221–33.
14. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000;5:415–8.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molmut
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Short communication

Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length

Rebeca Santiso^{a,b}, María Tamayo^{a,b}, Jaime Gosálvez^c, Marcos Meseguer^d,
 Nicolás Garrido^d, José Luis Fernández^{a,b,*}

^a INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Unidad de Genética, As Xubias, 84, 15006 A Coruña, Spain

^b Laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología, Centro Oncológico de Galicia, 15009 A Coruña, Spain

^c Unidad de Genética, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

^d IVI Valencia, Universidad de Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2009

Received in revised form 23 February 2010

Accepted 1 March 2010

Available online 10 March 2010

Keywords:

Sperm

Telomeres

Swim-up

DNA fragmentation

Sperm Chromatin Dispersion test

SCD

ABSTRACT

Telomere length and sperm DNA fragmentation were determined in sperm samples from 27 patients, using a quantitative PCR (Q-PCR) assay and the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test, respectively. Comparisons of the samples before and after swim-up processing demonstrated that this procedure selects a sperm population with longer average telomere size and lower frequency of sperm cells with fragmented DNA.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Telomeres are specialized chromatin structures at the end of the linear eukaryotic chromosomes. They perform a capping function, protecting chromosomes from degradation and end-to-end fusion. In humans, telomere DNA composition consists of approximately 5–15 kb of tandem arrays in a duplex G-rich sequence (5'-TTAGGG-3') and ending in a 3' single-strand overhang. Several arrays of protein complexes stabilize the telomeric structure and regulate telomere length [1,2].

After each round of DNA replication there is a progressive loss of 50–150 bp of terminal telomere sequences [1,2]. Telomerase is a specialized reverse transcriptase that synthesizes new telomeric repeats. Germ cells exhibit a strong telomerase activity, maintaining telomeres at their maximum length. In contrast, telomerase is not active or insufficiently active in most somatic cells. As a consequence, telomeres progressively shorten with ageing in replicating somatic cells. After a number of cell doublings, a telomeric sequence array may be critically shortened, thus losing its cap-

ping function. This then triggers replicative senescence, so the cell ceases proliferation or undergoes apoptosis [1,2]. Thus, telomere size limits the replicating potential and lifespan of somatic cells [2].

Human semen samples are heterogeneous in composition. It is essential when using sperm for therapeutic purposes to apply techniques that will remove dead and immotile sperm and non-sperm cells. The swim-up procedure [3,4] is routinely used in assisted reproduction laboratories to isolate a population of highly motile spermatozoa. These swim-up samples typically contain spermatozoa with more optimal biochemical, morphological and kinetic parameters as well as decreased DNA fragmentation [3,4]. In fact, a negative correlation between DNA breakage and motility has been reported [5].

In this study we evaluated telomere length in sperm samples that contained no cells other than spermatozoa, before and after swim-up. Moreover, sperm DNA fragmentation was evaluated in parallel to test for a possible relationship between DNA fragmentation and telomere length. The purpose of the present work was to assess whether the high motile sperm subpopulation has a different telomere size and frequency of DNA fragmentation with respect to the other sperm cells.

2. Materials and methods

The study was performed on 27 sperm samples from male partners of couples who presented to the andrology laboratory for infertility treatment, after informed

* Corresponding author at: Sección de Genética y Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, As Xubias, 84, 15006 A Coruña, Spain. Tel.: +34 981 287499; fax: +34 981 287122.

E-mail addresses: Jose.Luis.Fernandez.Garcia@sergas.es, joseluis.fernandez@cog.es (J.L. Fernández).

consent. According to the WHO criteria, two patients were assessed as being non-ozoospermic, nine as astenoteratozoospermic and sixteen as teratozoospermic. Semen samples containing cells other than spermatozoa were discarded because they could bias the results of telomeric size.

One aliquot of raw semen was cryopreserved whereas the other aliquot was processed by swim-up. Briefly, raw ejaculates were diluted 1:1 (vol:vol) with HTF (LifeGlobal, Barcelona, Spain), centrifuged at $400 \times g$ for 10 min, and the supernatants were discarded. 0.5–1 ml of fresh medium was added without disturbing the pellet and incubated for 45 min with a 45° inclination. Finally, the upper 0.1–0.5 ml was taken and cryopreserved.

The frequency of sperm cells containing fragmented DNA before and after swim-up was determined immediately after thawing with the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test, performed with the Halosperm® kit (Halotech DNA SL, Madrid, Spain) [6]. Using this technique, sperm cells immersed in an agarose microgel are treated with an acid solution followed by a lysing solution. Sperm nuclei with DNA fragmentation show very small halos or no halos of DNA dispersion, whereas those sperm nuclei without DNA fragmentation release their DNA loops forming large halos emerging from the core.

The average telomere length from the sperm cells, before and after swim-up, was measured with a validated quantitative (Q-PCR) based assay [7,8]. This method measures the average ratio of telomere repeat copy number to a single copy gene (36B4) copy number (*T/S* ratio) in each sample. Briefly, the Q-PCR technique was performed using a LightCycler thermocycler (LightCycler 480, Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada). Duplicate DNA samples were amplified in parallel 20 μ l PCR reactions that included 30 ng of sample DNA, the DNA master SYBR Green I kit (LightCycler® 480 Sybr Green I Master, Roche Diagnostics) and 500 nM of specific primers for the telomere (forward: 5'CGGTTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTG';

reverse 5'GGCTTGCCCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCT3') and for the 36B4 (forward: 5'CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC3'; reverse: 5'CCCATCTATCATCAACGGGTACAA3').

Thermal cycling for 1 cycle at 95°C for 10 min was followed by 35 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 1 min and 72°C for 10 s. The technique was optimized by developing standard curves using serial dilutions from a reference DNA, performed in each assay. The linear correlation coefficient (r^2) was >0.99 for both telomeric and 36B4 standard curves. The efficiency of the amplification was calculated from the slope of the linear curves. The average efficiency was 1.8 for telomeric amplification and 1.9 for 36B4 amplification. The *T/S* ratio was calculated using these efficiency values: $T/S \text{ ratio} = \text{efficiency}^{-\text{CpTel}} / \text{efficiency}^{-\text{Cp36B4}}$. The coefficients of variation among the different assays of telomere length and 36B4 were 2.4% and 0.9%, respectively. To avoid these variations among plates, the paired samples were introduced in the same plate of PCR, each in duplicate.

Data were analyzed using SPSS software (Chicago, IL, USA). Telomere length data and frequency of spermatozoa with fragmented DNA in unselected sperm were normally distributed as ascertained by the Kolmogorov–Smirnov test. The frequency of sperm cells with fragmented DNA in swim-up selected samples did not follow a normal distribution.

3. Results and discussion

The swim-up preparation selects highly motile spermatozoa from those with poor or no motility. The results indicate that the isolated, highly motile sperm population has reduced DNA

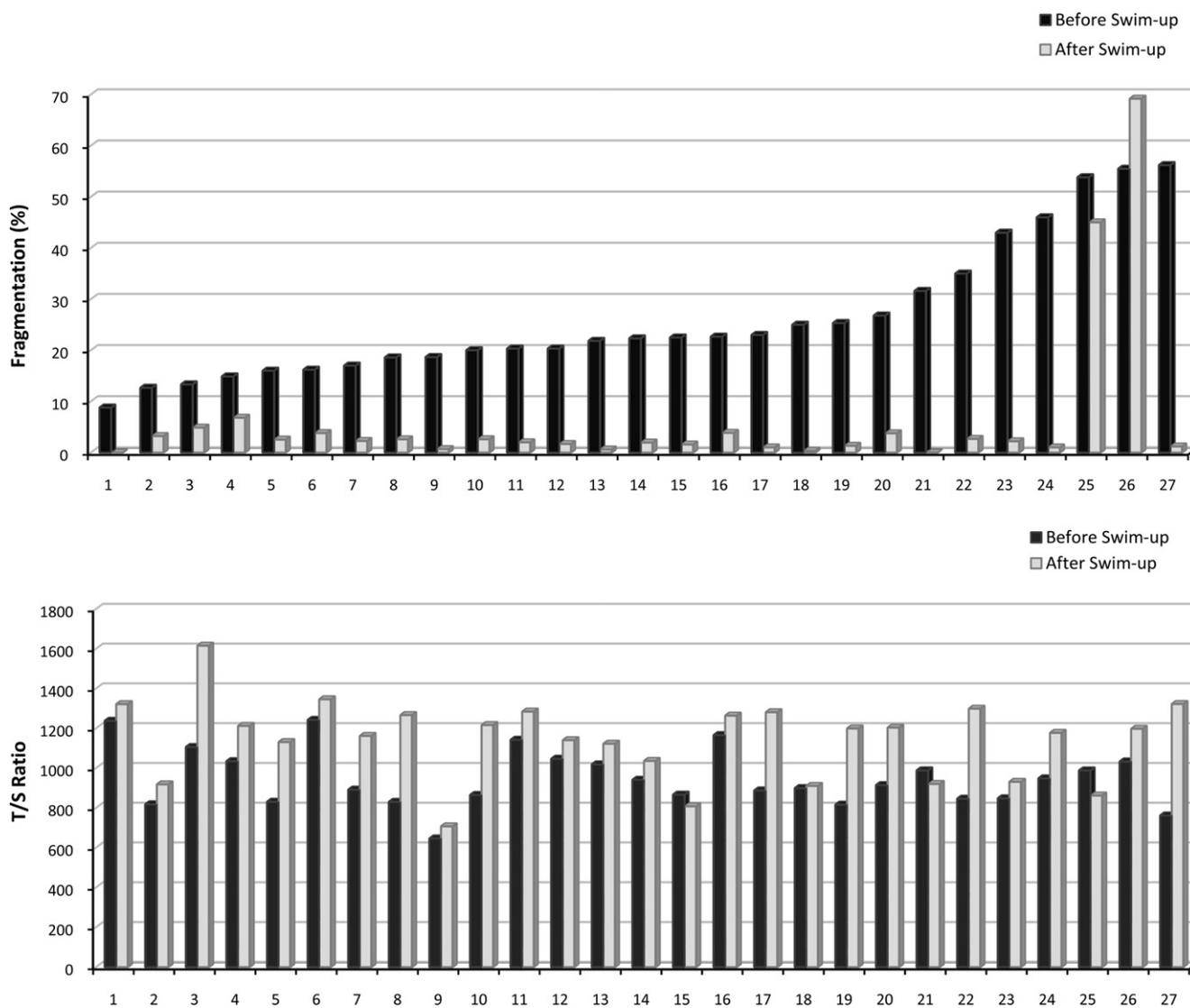


Fig. 1. Percentage of sperm cells with fragmented DNA (above) and average telomere length (*T/S* ratio; below) in 27 sperm samples, analyzed before and after swim-up. Samples have been ordered according to the increasing frequency of spermatozoa with fragmented DNA before swim-up treatment.

fragmentation compared to the raw semen. Only one specimen did not distribute similarly (Fig. 1, above). The magnitude of DNA fragmentation decrease was very high, from 26.20 ± 13.40 to 6.25 ± 15.12 in swim-up selected sperm cells (Wilcoxon's matched-pairs test, $p < 0.001$). The average telomere length in the highly motile population was greater than that from the raw-sperm in all samples but three (Fig. 1, below). The T/S ratio increased from 948.93 ± 144.82 to 1142.85 ± 199.54 in swim-up selected sperm cells (t -test for paired comparisons, $p < 0.001$). Although a decrease in sperm DNA fragmentation was accompanied by increase in T/S ratio after swim-up procedure, their magnitudes were not proportionate (Spearman's r correlation coefficient, $p > 0.05$).

It could be suspected that DNA fragmentation could influence the efficiency of DNA isolation, so the relative small DNA fragments could not be isolated with the bulk DNA. As a consequence, the loss of DNA fragments containing telomeric sequences could bias the results of the Q-PCR assay for estimation of telomere length. To test for this possibility, two sperm samples were incubated for 6 h and 24 h, at 37 °C. This progressively increased the frequency of sperm cells with fragmented DNA, from 5.7% at 0 h to 13.3% at 6 h and 46% at 24 h, in the first case, and from 41.7% at 0 h to 59.7% at 6 h and 78.3% at 24 h, in the second sample. The T/S ratio was very similar in each sample, independently of the DNA fragmentation yield, being 750.8 with a coefficient of variation of 2.3% in the first sample, and 831.4 with a coefficient of variation of 7.5% in the second sample. This experiment discarded telomeric DNA loss after DNA isolation of samples with fragmented DNA.

Unlike most somatic cells, germ line cells exhibit a strong telomerase activity, so telomeres are maintained at their maximum length. Nevertheless, despite containing the higher average telomere size, genome-wide telomere length from sperm cells seems to be variable among different individuals and even among different spermatozoa. In fact, severely truncated telomeres were detected in 3.5% of XpYp telomeres [9]. If this is extrapolated to the entire telomere, then only 19% of germ cells will contain a full set of telomeres with genome-wide length. This telomere truncation in the male germ line could contribute to the aneuploidy levels observed in human sperm.

Telomerase activity is not significant in mature oocytes and cleavage stage embryos, but is high in blastocysts. In spite of this, telomeres lengthen remarkably during the early cleavage cycles through a recombination-based mechanism [10]. However, after fertilization, the presence of critically shortened telomeres either coming from the sperm or the oocyte may contribute to abnormal cleavage and development, as demonstrated in knock-out mice [11]. In humans, it has been reported that telomere length in oocytes predicts cytoplasmic fragmentation, related to apoptosis, in embryos [12]. Hypothetically, despite presumed telomeric lengthening processes in embryo, the size of telomeres derived from sperm could influence embryo development.

The mature sperm fraction should be highly motile, with better DNA integrity and adequate telomere size. It may be speculated that during natural intercourse, a selection of these sperm cells

is produced in the female genital tract, improving the probability of oocyte fertilization by a healthy sperm. Swim-up may partially simulate this selection.

Telomere length is being considered a potential valuable biomarker of biological age and a forecaster of longevity [8]. In fact, it may be one important factor involved in limiting lifespan, at least at the cellular level [2]. Telomere length is partially genetically determined and is notably biased by paternal age, but is also influenced by internal and external factors [1,2,8]. Nevertheless, it would be of great interest to check if selecting sperm cells with higher telomeric size could possibly contribute to a potential genetic background to the individual for increased lifespan.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Sources of support

The work has been possible through a contract with the Consejo de Seguridad Nuclear from Spain.

Acknowledgement

We are grateful to Prof. Christopher de Jonge, Reproductive Medicine Center, Minnesota University, for his critical reading.

References

- [1] S.M. Bailey, J.P. Murnane, Telomeres, chromosome instability and cancer, *Nucleic Acid Res.* 34 (2006) 2408–2413.
- [2] P.M. Lansdorp, Telomeres and disease, *EMBO J.* 28 (2009) 2532–2540.
- [3] M. Spanò, E. Cordelli, G. Letter, F. Lombardo, A. Lenzi, L. Gandini, Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (1999) 29–37.
- [4] E.V. Younglai, D. Holt, P. Brown, A. Jurisicova, R.F. Casper, Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation, *Hum. Reprod.* 16 (2001) 1950–1953.
- [5] C.C. Huang, D.P. Lin, H.M. Tsao, T.C. Cheng, C.H. Liu, M.S. Lee, Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates, *Fertil. Steril.* 84 (2005) 130–140.
- [6] J.L. Fernández, L. Muriel, V. Goyanes, E. Segrelles, J. Gosálvez, M. Enciso, et al., Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test, *Fertil. Steril.* 84 (2005) 833–842.
- [7] R.M. Cawthon, Telomere measurement by quantitative PCR, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e47.
- [8] O.T. Njajou, R.M. Cawthon, C.M. Damcott, S.-H. Wu, S. Ott, M.J. Garant, et al., Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 12135–12139.
- [9] D.M. Baird, B. Britt-Compton, J. Rowson, N.N. Amso, L. Gregory, D. Kipling, Telomere instability in the male germline, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 45–51.
- [10] L. Liu, S.M. Bailey, M. Okuka, P. Muñoz, C. Li, L. Zhou, et al., Telomere lengthening early in development, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 1436–1441.
- [11] L. Liu, M. Blasco, J. Trimarchi, D. Keefe, An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development, *Dev. Biol.* 249 (2002) 74–84.
- [12] D.L. Keefe, S. Franco, L. Liu, J. Trimarchi, B. Cao, S. Weitzen, et al., Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women—toward a telomere theory of reproductive aging in women, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192 (2005) 1256–1260.

Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality

Marcos Meseguer, Ph.D.,^a Rebeca Santiso, Ph.D.,^{b,c} Nicolas Garrido, Ph.D.,^a Sandra García-Herrero, Ph.D.,^a Jose Remohí, M.D.,^a and Jose Luis Fernandez, M.D.^{b,c}

^a IVI, Universidad de Valencia, Valencia; ^b Sección de Genética y Unidad de Investigación, Hospital "Teresa Herrera," Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña; and ^c Centro Oncológico de Galicia, A Coruña, Spain

Objective: To quantify the effect of sperm DNA fragmentation (SDF) on reproductive outcome by evaluating the most statistically significant bias factors using logistic regression.

Design: Prospective blind observational cohort study.

Setting: University affiliated private IVF unit.

Patient(s): Two hundred ten male partners of couples undergoing in vitro fertilization (IVF) or first intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles with fresh or thawed sperm with the women's own or donated oocytes.

Intervention(s): None.

Main Outcome Measure(s): SDF determined before and after swim-up ($n = 420$), odds ratio calculated of the effect of an increase of one unit of SDF on pregnancy, and stratified regression analysis performed to evaluate the confusion effect of oocyte quality, sperm origin, and the fertilization procedure.

Result(s): The effect of SDF on pregnancy was not affected by sperm origin (fresh or thawed) or fertilization procedure when measured both before and after swim-up. When oocytes from infertile patients were employed, SDF had a statistically significant negative impact on chance of pregnancy. For every 10% increase in SDF, the probability of not achieving pregnancy increased by 1.31. When donated oocytes were employed, SDF did not have a statistically significant effect.

Conclusion(s): The effect of SDF on the probability of pregnancy can be calculated independent of the fertilization procedure or sperm origin. Oocyte quality conditions the extent of the negative impact of SDF on pregnancy; this can be overcome when good quality oocytes are employed. (Fertil Steril® 2011;95:124–8. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: DNA, fertilization process, fragmentation, oocyte quality, sperm, sperm cryopreservation, swim-up

The genetic integrity of the male gamete is essential for a successful and healthy pregnancy (1). Data in the literature suggest that the frequency of sperm cells with massive DNA fragmentation is a marker of sperm quality and a potential predictor of fertility (2, 3). Sperm DNA fragmentation (SDF) could be a result of unrepaired DNA breakage produced during the process of chromatin remodeling, or could be a consequence of an apoptoticlike DNA degradation process (4). Oxidative stress may also induce SDF, when reactive oxygen species (ROS) generation overcomes the antioxidant-scavenging activities of ROS (5). Additionally, after ejaculation, the incidence of SDF can change rapidly during the handling and preparation of samples for assisted reproduction (6, 7).

Several studies have shown that male fertility is affected by sperm DNA damage (8). Our group previously demonstrated the direct implications of DNA fragmentation, measured by use of the sperm chromatin dispersion (SCD) test, on in vitro fertilization (IVF) outcome (9). The determination of SDF could be of special interest with

couples who have low implantation rates and low embryo quality (9). Levels of SDF in testicular sperm also have been analyzed using the SCD test, and have been shown to be comparable with those in the ejaculated sperm of infertile and cancer patients and significantly higher than those in sperm donors (10). Some studies have hinted that the probability of achieving a viable pregnancy is low when a sperm sample contains >30% of SDF (11).

Progress in assisted reproductive techniques (ART) has allowed the efficacy of using frozen-thawed semen to be enhanced. Sperm cryostorage is indicated when donor sperm is employed in ART programs; schedule difficulties mean that samples are not always delivered at the time of oocyte retrieval, and a quarantine period is necessary in all cases. Cryopreservation is known to be a procedure that damages the cell and may lead to deleterious alterations in sperm structure (e.g., membrane, mitochondria, DNA) (12–14).

When analyzing the molecular components of sperm, including DNA integrity, and their relationship with embryo quality and IVF success, female etiology should be taken into account. Ovum donation is a useful tool with which to study the quality of sperm used in assisted reproduction treatments, because it reduces the variability of oocyte quality associated with female infertility. In relation to this, an absence of an association between SDF and pregnancy could be explained by the ability of the oocyte to repair broken sperm DNA.

We quantified the effect on reproductive outcome of SDF in sperm samples from patients undergoing IVF or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with fresh or frozen-thawed sperm, using standard or donated oocyte cycles, and employing logistic

Received February 16, 2010; revised May 23, 2010; accepted May 24, 2010; published online July 19, 2010.

M.M. has nothing to disclose. R.S. has nothing to disclose. N.G. has nothing to disclose. S.G.-H. has nothing to disclose. J.R. has nothing to disclose. J.L.F. has nothing to disclose.

Financed by IMPIVA (Generalitat Valenciana) grant IMIDTF/2009/146 and Consejo de Seguridad Nuclear (SRO/2667/2009/640).

Presented in part at the 35th Meeting of the American Society of Andrology, Houston, Texas, April 10–13, 2010.

Reprint requests: Marcos Meseguer, Ph.D., Instituto Valenciano de Infertilidad, Plaza de la Policía Local 3, Valencia 46015, Spain (FAX: 34-96-3050999; E-mail: marcos.meseguer@ivi.es).

regression analysis. Ultimately, these variables are relevant as bias factors that can interfere with statistical analyses.

MATERIALS AND METHODS

A prospective blind observational cohort study of sperm samples from a total of 210 male partners of couples undergoing IVF or ICSI between January 2009 and September 2009 was designed and approved by the institutional review board of the Instituto Valenciano de Infertilidad. The following inclusion criteria were established: female partner aged between 30 and 45 years and undergoing her first IVF cycle and with a body mass index below 30 kg/m². Transfer was always performed approximately 72 hours after oocyte retrieval. Exclusion criteria included the presence of a uterine pathology (adenomyosis or uterine dysfunctions), significant endocrinology or metabolic dysfunctions, recurrent loss of pregnancy, and severe oligospermia (>1 million/mL).

Fresh and frozen-thawed sperm samples employed in IVF or ICSI with standard or donated oocytes (n = 420 samples) were analyzed before and after swim-up. Semen aliquots (10 to 100 μ L) were taken from each sample for processing by means of the SCD assay, using the Halosperm kit (Halotech DNA, SL, Madrid, Spain). Sperm aliquots were frozen in liquid nitrogen, coded, and sent to the Complejo Hospitalario Universitario A Coruña for processing and scoring in a blind manner (15).

For controlled ovarian hyperstimulation (COH), gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist protocols were used as previously described elsewhere (16). Oocyte donor recruitment and management and steroid replacement were performed following protocols that have also been described elsewhere, and were screened for sexually transmitted diseases (human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus included) (17).

ART Procedures

Recovered oocytes were inseminated using micromanipulation (ICSI) or a previously described insemination technique (18). A total of 182 first ICSI and 28 first IVF cycles employing oocyte donation (n = 112) and own oocytes (n = 98) were studied. Clinical pregnancy was confirmed when a gestational sac with fetal heartbeat was detected by ultrasound at 7 weeks of pregnancy. Miscarriage was determined when a pregnancy failed to reach the 22nd week of pregnancy after detection of a gestational sac.

Statistical Analysis

The odds ratio (OR) of the effect of an increase of one unit of SDF on pregnancy and miscarriage was expressed in terms of 95% confidence interval (CI) and statistical significance. In the regression analysis, a stratified test was performed to evaluate oocyte quality as a bias factor (oocytes coming from infertile patients and from fertile young donors), and the fertilization procedure and sperm origin (fresh or frozen-thawed) were considered as possible confusion factors (CF) in both groups. The CFs were studied via two criteria: first, the statistical relationship between fertilization procedure and sperm origin on the one hand and pregnancy on the other; and second, the relationship of these parameters with SDF. These relationships were evaluated by a chi-square test or Fisher's test (when reduced n was present) and a *t*-test or Mann-Whitney (where distribution was not normal or n <30) ($P < .05$) (19). These factors were also analyzed using logistic regression to determine how they modified the effect of SDF on pregnancy rate. In this way, we created a new variable that represented the interaction of sperm origin (fresh or frozen-thawed) or fertilization procedure (IVF or ICSI) with SDF. The variable obtained was submitted to computer analysis (Wald method), and those with $P > .05$ were not considered as modifiers of the effect (20). After this statistical analysis, the variables in question were classified as those that statistically significantly confused or modified the effect of SDF on the parameters of the outcome under consideration.

By performing the logistic regression analysis, the effect of SDF on pregnancy and miscarriage was quantified. Statistical significance was calculated using the omnibus test (likelihood ratio), and the uncertainties uncovered by the model were evaluated by Nagelkerke R², a coefficient that is analogous to the R² index of the linear regression analysis. We employed receiver operating characteristic (ROC) curves to test the predictive value of SDF with

respect to achievement of pregnancy. The ROC curve analysis provides area under the curve (AUC) values between 0.5 and 1.0 and can be interpreted as a measurement of the global classification ability of the model. When determining predictive power, an AUC >0.8 is considered acceptable for a clinical test. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences 17 (SPSS Inc., Chicago, IL) and MedCalc Software (Ghent, Belgium).

RESULTS

The mean age of the male patients of our study population was 38.78 years (standard deviation [SD] = 5.99). The mean age of our female population was 37.85 years (SD = 5.45). The etiology of female infertility was poor oocyte quality in 36.2% (n = 76), advanced maternal age in 33.1% (n = 69), premature ovary failure in 10.6% (n = 22), normal in 7.5% (n = 15), tubal obstruction in 5.0% (n = 10), low ovary response in 4.4% (n = 9), and severe male factor infertility in 3.1% (n = 6). The estradiol levels before human chorionic gonadotropin (hCG) injection were 2,095.4 (SD = 1,078.6) pg/mL.

Combined Effect of the Sperm Freezing-Thawing Process and Swim-up on Levels of SDF

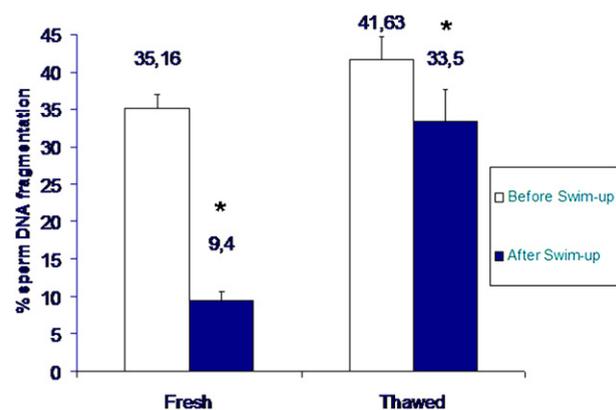
We analyzed the effect of swim-up on SDF and found a statistically significant reduction from 36.83% (SD = 1.60) to 15.84 (SD = 1.60) ($P < .001$) after swim-up. We also analyzed the effect of sperm freezing-thawing on SDF and how this effect was modified by swim-up. Levels of SDF were statistically significantly reduced after swim-up, and this decrease was more pronounced in the case of fresh sperm (Fig. 1). These results encouraged us to investigate the effect of SDF on reproductive outcome in each of these conditions.

Effect of SDF on Pregnancy Success Using Oocyte Quality as a Bias Factor

To determine the effect of SDF on pregnancy success using oocyte quality as a bias factor, a stratified analysis was performed.

FIGURE 1

Percentage of cells with sperm DNA fragmentation (SDF) with respect to sperm origin (fresh or frozen thawed). Levels of SDF before and after swim-up preparation before ART are also represented. *Statistically significant difference, $P < .05$.



Meseguer. Sperm DNA damage conditioned by oocyte. *Fertil Steril* 2011.

TABLE 1**Variations in sperm DNA fragmentation in the different groups analyzed.**

Cycle	Swim-up	Fresh	Frozen	P value	IVF	ICSI	P value
Standard	Before	26.3% (SD 2.0)	31.2 (SD 7.4)	NS	31.1% (SD 2.1)	25.3% (SD 8.6)	NS
	After	9.2% (SD 2.0)	12.1 (SD 4.1)	NS	11.6% (SD 4.4)	9.6 (SD 1.6)	NS
Oocyte donation	Before	32.4% (SD 3.5)	33.7% (SD 3.2)	NS	33.9% (SD 2.5)	28,3% (SD 7.3)	NS
	After	9.2% (SD 2.0)	30.5% (SD 4.8)	NS	22.1% (SD 3.0)	13.1 (SD 3.0)	NS

Note: IVF = in vitro fertilization; ICSI = intracytoplasmic sperm injection; NS = not statistically significant; SD = standard deviation.

Meseguer. Sperm DNA damage conditioned by oocyte. *Fertil Steril* 2011.

Own Oocytes

The sperm freezing procedure was evaluated as a CF before swim-up. The first criterion of CF was not confirmed, as the pregnancy rate with fresh samples was 53.8% (50 out of 93) versus 60.0% (three out of five) with frozen/thawed samples ($P=.538$). Neither was the second criterion fulfilled (Table 1), as sperm origin did not modify the effect of SDF on the possibility of pregnancy (evaluated by regression logistic analysis) (Wald $P=.189$).

Second, the sperm fertilization procedure was evaluated as a CF. The first criterion was not fulfilled as pregnancy rates did not differ between IVF (50.0%, four out of eight) and ICSI (54.4%, 49 out of 90) ($P=.536$). Neither was the second criterion met (see Table 1). The sperm fertilization procedure did not modify the effect of SDF on chance of pregnancy (Wald $P=.905$). The same evaluation was repeated after swim-up (see Table 1). Sperm origin and the sperm fertilization procedure were not found to be CFs or to modify the possibility of pregnancy.

With the results of the stratified analysis, we defined a logistic regression model of the effect of SDF before and after swim-up on pregnancy in which sperm origin (fresh or frozen) and fertilization procedure were not included, and we repeated the analysis for probability of miscarriage (Table 2). As a result, the following quantification of the effect of SDF on reproductive outcome was established: for every 10% increase in SDF, the probability of not becoming pregnant increased by 1.31. A ROC curve analysis was performed to illustrate the predictive properties of SDF with respect to chance of achieving pregnancy. Table 3 shows the results of this analysis, which reveal that the predictive properties of SDF after and before swim-up were null.

Oocyte Donation Cycles (Young Fertile Female Population)

We evaluated the sperm freezing procedure as a CF before swim-up. The first criterion was not fulfilled, as the pregnancy rate with fresh

samples was 56.6% (34 out of 60) versus 55.8% (29 out of 52) with frozen/thawed samples ($P=.924$). Neither was the second criterion met (see Table 1). Sperm origin did not modify the effect of SDF on probability of pregnancy (evaluated by regression logistic analysis) (Wald $P=.568$).

Second, we analyzed the sperm fertilization procedure as a CF. The first criterion was not fulfilled, as pregnancy rates in IVF (13 out of 21, 61.9%) and ICSI (50 out of 91, 54.9%) revealed no statistically significant difference ($P=.562$). Neither was the second criterion met (see Table 1). The sperm fertilization procedure did not modify the effect of SDF on the chance of achieving pregnancy (Wald $P=.601$). The same evaluation was repeated after swim-up (see Table 1). Sperm origin and sperm fertilization procedure were not found to be CFs or modifying factors.

With these results, we defined a logistic regression model of the effect on pregnancy of SDF before and after swim-up in which sperm origin (fresh or frozen) and fertilization procedure were not included, and the analysis was repeated for miscarriage (see Table 2). In this case, we were unable to quantify the effect of SDF on reproductive outcome due to the lack of statistical significance of the model. The ROC curve analysis to determine the predictive properties of SDF with respect to probability of pregnancy also revealed an absence of predictive power both before and after swim-up (see Table 3).

DISCUSSION

Knowledge acquired within the field of mutagenesis for many different cell types has demonstrated that, when DNA damage is extensive, some lesions remain unrepaired or are misrepaired. This is likely to occur when an oocyte is fertilized with a sperm cell whose DNA is totally fragmented. Pregnancy is unlikely in such cases. This suggests that a sperm population without seriously fragmented DNA and in contact with spermatozoa with SDF may sustain some DNA

TABLE 2**Logistic regression analysis of the effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy and miscarriage in standard cycles and oocyte donation cycles.**

Cycle outcome	Odds ratio	95% confidence interval	R ² Nagelkerke	Statistical significance
Standard				
Pregnancy	0.973	0.948–0.999	0.069	.037
Miscarriage	1.002	0.968–1.037	0.000	.908
Oocyte donation				
Pregnancy	0.991	0.971–1.010	0.013	.381
Miscarriage	1.012	0.988–1.036	0.017	.343

Meseguer. Sperm DNA damage conditioned by oocyte. *Fertil Steril* 2011.

TABLE 3**Predictive properties of sperm DNA fragmentation on pregnancy by receiver operating characteristic analysis.**

Cycle	Swim-up	AUC (95% CI)	Cut-off value	Sensibility	Specificity
Standard	Before	0.635 (0.521–0.738)	<27.1%	64.4%	67.6%
	After	0.518 (0.403–0.632)	<9.7%	78.6%	40.5%
Oocyte donation	Before	0.559 (0.443–0.670)	<28.5%	48.8%	67.6%
	After	0.554 (0.434–0.670)	<26.7%	35.1%	85.0%

Note: AUC = area under the curve; CI = confidence interval.

Meseguer. Sperm DNA damage conditioned by oocyte. *Fertil Steril* 2011.

damage in what can be referred to as an iceberg effect (21–23). In this case, if the sperm cell has suffered only slight DNA damage, the oocyte should be able to repair it, but the extent of this repair will depend on the quality of the oocyte. Thus, embryonic development failure may occur as a result of DNA misrepair in the oocyte. This inadequate repair will depend on age, ovarian environment, and level of fertility, which are all variables of donated oocytes (24).

The influence of SDF in fertility is well illustrated in animal models such as the mouse. A recent report in mice concerning ICSI with a high percentage of SDF showed that a significant proportion of adult offspring performed abnormally in behavioral tests and exhibited malformations, tumors, and premature aging (25). In the case of humans, despite its ramifications for fertilization and embryo quality, embryo selection after IVF or ICSI is likely to reduce the negative impact of SDF on pregnancy outcome (9). We found that SDF had a statistically significant effect when an infertile woman's own oocytes were employed, regardless of whether embryo selection was performed. Obviously, many ART procedures are performed on relatively mature women with a high probability of low-quality oocytes.

Ours is the first report of SDF analysis of sperm using the SCD test to compare patients whose own oocytes were used in fertility treatments with patients receiving oocytes from young and fertile donors. The data obtained suggest that the effect of SDF on probability of pregnancy can be calculated independent of the fertilization procedure employed or sperm origin. Moreover, oocyte quality conditioned the effect of SDF, as it was not found to have any clinical significance in fertile women with good-quality oocytes.

The process by which sperm fertilize the oocyte does not appear to be conditioned by the levels of SDF. In addition, the process of freezing and thawing does not directly affect the integrity of the DNA but increases the susceptibility of the DNA to damage during the process of sperm preparation for ART. These results can be partially explained by the high levels of SDF observed in frozen-thawed samples after swim-up with respect to those of fresh samples.

Studies using different techniques for DNA damage visualization have suggested several threshold values for the percentage of damaged spermatozoa in the ejaculate above which fertilization and developmental competence is compromised (2, 26, 27). We did not establish such a threshold in this study, as was the case in our previously published work (1, 9, 10, 15, 28–31).

There is no doubt that the prediction of male fertility according to SDF could be improved if additional important parameters were determined. For example, the dynamics of SDF, by which we refer to an increasing rate of SDF over time after ejaculation or thawing, are a factor that may need to be taken into account (7).

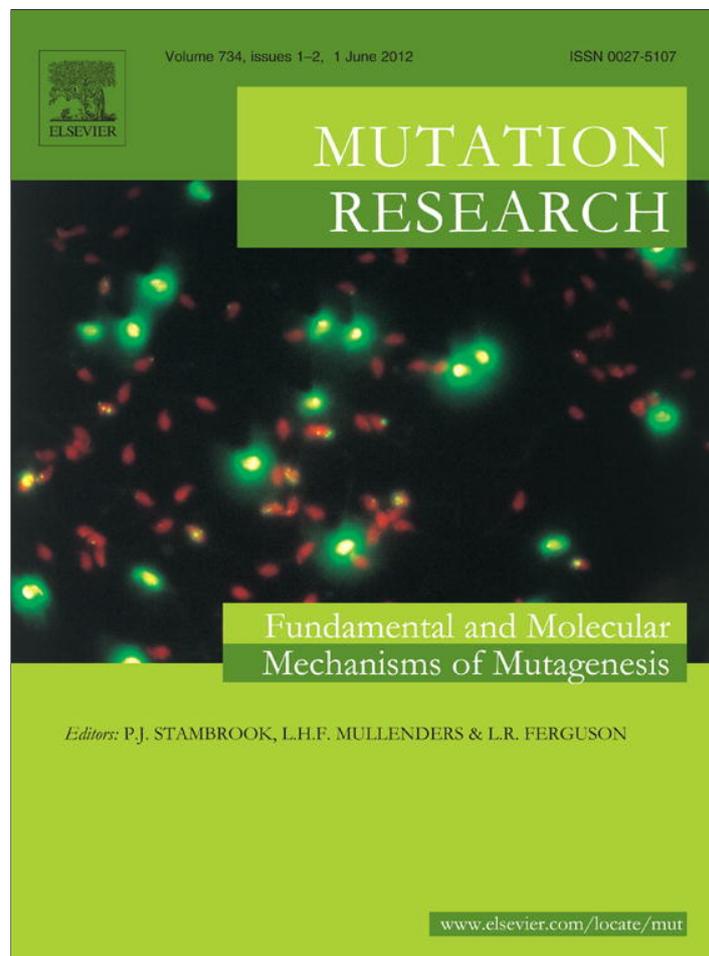
Although DNA fragmentation adversely influences pregnancy rates, it is ultimately a problem that combines male (damaged DNA) and female (capacity to repair DNA) factors. In this way, the problem of reduced sperm DNA integrity is a result of infertility of mixed origin. This may be one of the reasons for the disparity between the correlations of SDF and fertility reported by different studies. Moreover, it must be said that it is difficult to isolate the real influence of SDF in clinical studies because, while sperm DNA integrity can be evaluated and contrasted, oocyte repair capacity remains an enigma.

REFERENCES

- Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertil Steril* 2010;93:314–8.
- Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174–9.
- Vélez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jiménez C, Wittemer C, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril* 2008;90:1792–9.
- Garrido N, Remohí J, Martínez-Conejero JA, García-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online* 2008;17:855–65.
- Garrido N, Meseguer M, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 2004;6:59–65.
- Gosálvez J, Cortes-Gutierrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Nuñez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril* 2009;92:170–3.
- Gosálvez J, Cortes-Gutierrez EI, Nuñez R, Fernández JL, Caballero P, López-Fernández C, et al. A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril* 2009;92:1915–9.
- Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007;14:746–57.
- Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohí J, Pellicer A, de los Santos MJ, et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006;85:371–83.
- Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, Remohí J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 2009;92:1638–45.
- Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 2006;12:715–21.
- Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spano M, Dondero F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell Tissue Bank* 2006;7:91–8.

13. Schuffner A, Morshedi M, Oehninger S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. *Hum Reprod* 2001;16:2148–53.
14. Vilorio T, Rubio MC, Rodrigo L, Calderón G, Mercader A, Mateu E, et al. Smoking habits of parents and male: female ratio in spermatozoa and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2005;20:2517–22.
15. Muriel L, Meseguer M, Fernández JL, Álvarez J, Remohí J, Pellicer A, et al. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod* 2006;21:738–44.
16. Melo MA, Garrido N, Álvarez C, Bellver J, Meseguer M, Pellicer A, et al. Antral follicle count (AFC) can be used in the prediction of ovarian response but cannot predict the oocyte/embryo quality or the in vitro fertilization outcome in an egg donation program. *Fertil Steril* 2009;91:148–56.
17. Garrido N, Zuzuarregui JL, Meseguer M, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Sperm and oocyte donor selection and management: experience of a 10 year follow-up of more than 2100 candidates. *Hum Reprod* 2002;17:3142–8.
18. Meseguer M, Garrido N, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Martínez-Jabaloyas JM, et al. Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum Reprod* 2003;18:1281–5.
19. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. 2nd ed. New York: Wiley, 2000.
20. Hauck WW, Donner A. Wald's test as applied to hypothesis in logit analysis. *J Am Stat Assoc* 1977;72:851–3.
21. López-Fernández C, Fernández JL, Gosálbez A, Arroyo F, Vázquez JM, Holt WV, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals, III: Ram. *Theriogenology* 2008;70:898–908.
22. Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod* 2008;23:233–9.
23. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25–43.
24. Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17725–9.
25. Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramírez MA, Pericuesta E, et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008;78:761–72.
26. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;87:93–100.
27. Sergerie M, Miesusset R, Daudin M, Thonneau P, Bujan L. Ten-year variation in semen parameters and sperm deoxyribonucleic acid integrity in a healthy fertile man. *Fertil Steril* 2006;86:1513.e11–18.
28. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Fernández JL. The effect of cancer on sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2008;90:225–7.
29. Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril* 2008;89:1191–9.
30. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, Remohí J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 2008;92:1638–45.
31. Vilorio T, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M. Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil Steril* 2007;88:523–5.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.elsevier.com/locate/molmut)

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molmut
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



DNA fragmentation dynamics allows the assessment of cryptic sperm damage in human: Evaluation of exposure to ionizing radiation, hyperthermia, acidic pH and nitric oxide

Rebeca Santiso^{a,b}, María Tamayo^{a,b}, Jaime Gosálvez^c, Steve Johnston^d, Alfonso Mariño^e, Carlos Fernández^f, Carlos Losada^f, José Luis Fernández^{a,b,*}

^a Laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología, Centro Oncológico de Galicia, Doctor Camilo Veiras 1, 15009-A Coruña, Spain

^b Genetics Unit, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), As Xubias, 84, 15006-A Coruña, Spain

^c Genetics Unit, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^d School of Agriculture and Food Science, The University of Queensland, Gatton 4343, Australia

^e Servicio de Oncología Radioterápica, Centro Oncológico de Galicia, Doctor Camilo Veiras 1, 15009-A Coruña, Spain

^f Servicio de Radiofísica, Centro Oncológico de Galicia, Doctor Camilo Veiras 1, 15009-A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2011

Received in revised form 27 February 2012

Accepted 15 March 2012

Available online 24 March 2012

Keywords:

Sperm

DNA fragmentation

Dynamic assay

SCD test, Cryptic damage

ABSTRACT

Sperm DNA fragmentation (SDF) is not a static seminal parameter, since the longevity of sperm DNA decreases progressively with time following ejaculation or thawing. While the dynamics of SDF is a species-specific characteristic, in the case of humans, there is still significant variation within patients. To evaluate the suitability of the dynamic SDF assay to assess the adverse effects of agents that cause genetic damage, fresh semen samples from different donors were exposed *in vitro* to (1) increasing acute doses of ionizing radiation, (2) elevated temperature (41 °C and 45 °C), (3) acidic pH (pH 4) and (4) the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP). Sperm DNA fragmentation was analyzed after an incubation period of chronic (24 h), or acute (1 h) exposure to each treatment followed by incubation at 37 °C over a period of 24 h. SDF was assessed using the sperm chromatin dispersion (SCD) test. Dynamic SDF for each treatment was analyzed using Kaplan–Meier survival curves. All agents, except for ionizing radiation, accelerated SDF kinetics following chronic exposure over a 24 h period. Transient exposure to NO and heat but not acidic pH increased the basal (T0) level of SDF. Despite the removal of the three toxicants, the remaining sperm following acute exposure showed a decrease in their expected DNA longevity. It is concluded that the assessment of sperm DNA fragmentation dynamics is an effective methodological approach for revealing latent damage associated with toxicants that is not initially expressed following a single initial observation of SDF.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Every human ejaculate contains a proportion of sperm with fragmented DNA but this fraction may be elevated in patients with idiopathic infertility, obstructive or secretory azoospermia, varicocele, infections or cancer [1]. High levels of sperm DNA fragmentation (SDF) have also been associated with decreased oocyte fecundation, embryo quality and pregnancy rate [1,2]. Intriguingly, an intracytoplasmic sperm injection (ICSI) study of mouse oocytes, using spermatozoa with a high percentage of SDF, revealed

that a significant proportion of adult offspring produced by this procedure, showed a significant increase in the incidence of abnormal behavioral tests, malformations, tumors and signs of premature aging [3]. SDF is also an informative biomarker in studies of reproductive toxicology, as exposure of the testis to reproductive toxicants, such as thermal stress, ionizing radiation, chemotherapy, pesticides, air pollution and smoking have all resulted in a higher incidence of sperm DNA damage [4–6].

Given the recognized instability of the sperm cell post ejaculation, standard seminal parameters such as motility and vitality are typically evaluated at different times following collection or during semen processing. To the contrary, the frequency of sperm with fragmented DNA continues to be reported by andrology laboratories as a static number, without appropriate acknowledgment that sperm DNA is equally as susceptible to iatrogenic damage. Recent studies of human spermatozoa have indicated that SDF is in fact not stable, and that the frequency of sperm cells with fragmented

* Corresponding author at: Unidad de Genética, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), As Xubias, 84, 15006-A Coruña, Spain.
 Tel.: +34 981 178000x292121.

E-mail addresses: Jose.Luis.Fernandez.Garcia@sergas.es, joseluis.fernandez@cog.es (J.L. Fernández).

DNA tends to increase with time after sample collection or following thawing of cryopreserved spermatozoa [7–10]; these studies have clearly shown that when examined in terms of fragmentation dynamics, human sperm DNA degrades progressively. A general standard pattern and velocity for human sperm DNA degradation has recently been established and appears to be distinctive from that of other mammals [7,11]. Nevertheless, apparent variation in the kinetics of SDF among individual donors or patients means that this phenomenon can potentially be used as a diagnostic or as a predictive measure of fertility.

The SDF dynamics evaluated by *in vitro* incubation provides important information about the evolution of DNA integrity in the mature spermatozoon that is typically not revealed on basal assessment of SDF [12]. In this paper, we examine the effect of known toxicants on the SDF rate of donors, in order to validate the dynamic procedure as a reliable assay within the context of reproductive toxicology. Semen samples from different donors were exposed *in vitro* to increasing doses of ionizing radiation, elevated temperature, an acidic pH environment and the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP). Spermatozoa were incubated to mimic both chronic (24 h incubation at 37 °C) and acute (1 h) exposure of each toxicant and thereby improve the clinical relevance of the procedure. The overarching hypothesis of these investigations was that dynamic assessment of sperm DNA following exposure of sperm to known toxicants will reveal cryptic damage that is not normally revealed by a single initial baseline assessment of the SDF.

2. Material and methods

Semen samples were obtained from normozoospermic fertile donors, after informed, written consent.

2.1. Effect of ionizing radiation

Semen samples from three donors (A–C) were collected by masturbation and distributed into aliquots in insulin sterile syringes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Immediately after collection and dilution, the spermatozoa were exposed in a Clinac 2100 C/D radiotherapy unit (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA) to different doses of X-rays 6 MeV: 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 Gy, at 6.6 Gy/min. Following acute X-ray exposure, the spermatozoa were incubated at 37 °C for 0, 2, 4, 6, 8 and 24 h. After each incubation time period, samples were removed and processed to determine the percentage of sperm cells with fragmented DNA (%SDF) using the sperm chromatin dispersion (SCD) test, according to the instructions supplied with the kit (Dyn-Halosperm® kit, Halotech DNA SL, Madrid, Spain [13]). Using this technique, sperm cells immersed in an agarose microgel are treated with an acid solution followed by a lysing solution. Sperm nuclei with DNA fragmentation show very small halos or no halos of DNA dispersion, whereas those sperm nuclei without DNA fragmentation release their DNA loops forming large halos emerging from the core. Three hundred spermatozoa were scored per experimental point.

2.2. Effect of hyperthermia

Fresh semen samples from three donors (D–F) were incubated at 37 °C, 41 °C and 45 °C in a water bath over a 24 h period (chronic treatment) and aliquots of spermatozoa collected at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 h to determine %SDF. In order to induce a transient heat stress exposure, aliquots of the original sample were also incubated at 41 °C and at 45 °C for 1 h (acute treatment) and then subsequently cooled to 37 °C and incubated. Aliquots of spermatozoa were subsequently examined at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 h to determine %SDF; T0 represented the period immediately after 1 h incubation at the elevated temperature. SDF was determined following the method described above.

2.3. Effect of acidic pH

Fresh semen samples from two donors (G and H) were collected by masturbation. The pH of one aliquot was changed to 4 by adding a citric acid solution (1.5 M; pH 1.34); another aliquot of these semen samples was also processed as the control sample (pH 8). Spermatozoa were then incubated at 37 °C at the respective pH for 24 h (chronic treatment). In order to mimic a transient exposure to an acidic environment (pH 4), aliquots of the original semen sample were also exposed to pH values of 4 and 8 (control samples) for 1 h (acute treatment), centrifuged and re-suspended in PBS (pH 7) and then further incubated at 37 °C for 24 h. Aliquots of spermatozoa were collected at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 h to determine %SDF; T0

represented the period immediately after 1 h incubation at the designated pH. SDF was determined following the method described above.

2.4. Effect of NO

Semen samples from three donors (I–K) were collected by masturbation and immediately incubated at 37 °C for 24 h (chronic treatment) with 0, 5, 10, 25 and 50 mM SNP (Sigma, Madrid). Aliquots of each sample were collected at 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 h to determine %SDF. In order to mimic a transient exposure to NO, aliquots of the original semen sample were also exposed to SNP for a period of 5 min (acute treatment), then centrifuged, re-suspended in PBS (pH 7) and incubated at 37 °C for a 24 h period. Aliquots of spermatozoa were collected at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 h to determine %SDF, where T0 represented the period immediately after the acute 5 min incubation with SNP. Incubations in all experiments were performed in darkness, as SNP is light sensitive. SDF was determined following the method described above.

2.5. Statistical analysis

All data were analyzed using the SPSS 19 software package for Windows (SPSS Inc., Chicago). Pearson chi-square test was performed to assess if the acute treatment affected the %SDF immediately after the treatment (T0). To determine if treatments modified the dynamics of SDF over time, survival curves using a Kaplan–Meier analysis were determined; this approach reported the newly fragmented sperm DNA cells that appeared after each incubation time. The curves were compared using a log-rank test. During the analysis it was revealed that some sperm samples had similar dynamics but exhibited different basal %SDF values, so the test may have indicated significant differences in kinetics that were not real. This problem was evident when comparing the dynamics from the different donors and the dynamics that resulted after acute treatments, which affected the background of SDF. To avoid this complication, the SDF dynamics were standardized by subtracting the background SDF from each incubation time, thus producing a common starting survival value of 100% survival. Significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of ionizing radiation

The effect of X-ray dose on SDF dynamics of the three donors is shown in Fig. 1. While 3 donors showed DNA fragmentation dynamics within the normative range, X-ray dose, even as high as 10 Gy/min, had no apparent effect on the SDF dynamics of any of the donors.

3.2. Effect of hyperthermia

The effect of 24 h incubation at 37 °C, 41 °C and 45 °C of the 3 donors (D–F) is shown in Fig. 2. Significant differences in SDF were found between the three incubation temperatures ($p < 0.001$); the higher the incubation temperature, the higher the rate of SDF. In the case of acute heat stress for only 1 h, SDF increased immediately after the hyperthermic exposure and similar to that which occurred in the chronic heat stress, the higher incubation temperature was associated with a higher rate of increase in SDF. In fact, after 1 h at 45 °C, the T0 level of SDF was nearly double that of spermatozoa maintained at 37 °C (Fig. 2). The SDF rate following the acute heat stress period was accelerated, but less than that during chronic hyperthermia. In donor D, no significant difference was found between the 41 °C and 45 °C rates of SDF but both were higher when compared to the 37 °C rate. For donor E, the survival curves between 37 °C and 41 °C were statistically significant. For individual F, the higher temperatures of incubation resulted in rates of SDF that were significantly higher than the 37 °C rate ($p < 0.001$).

3.3. Effect of acidic pH

Continuous chronic exposure to pH 4 increased the SDF rate over time when compared to pH 8 for both donors ($p < 0.001$) (Fig. 3); there was no difference in rate of SDF between donors ($p = 0.83$). Both pH 4 sperm samples reached 100% SDF at 8 h incubation at 37 °C. Immediately following an acute exposure to pH 4 for 1 h, the

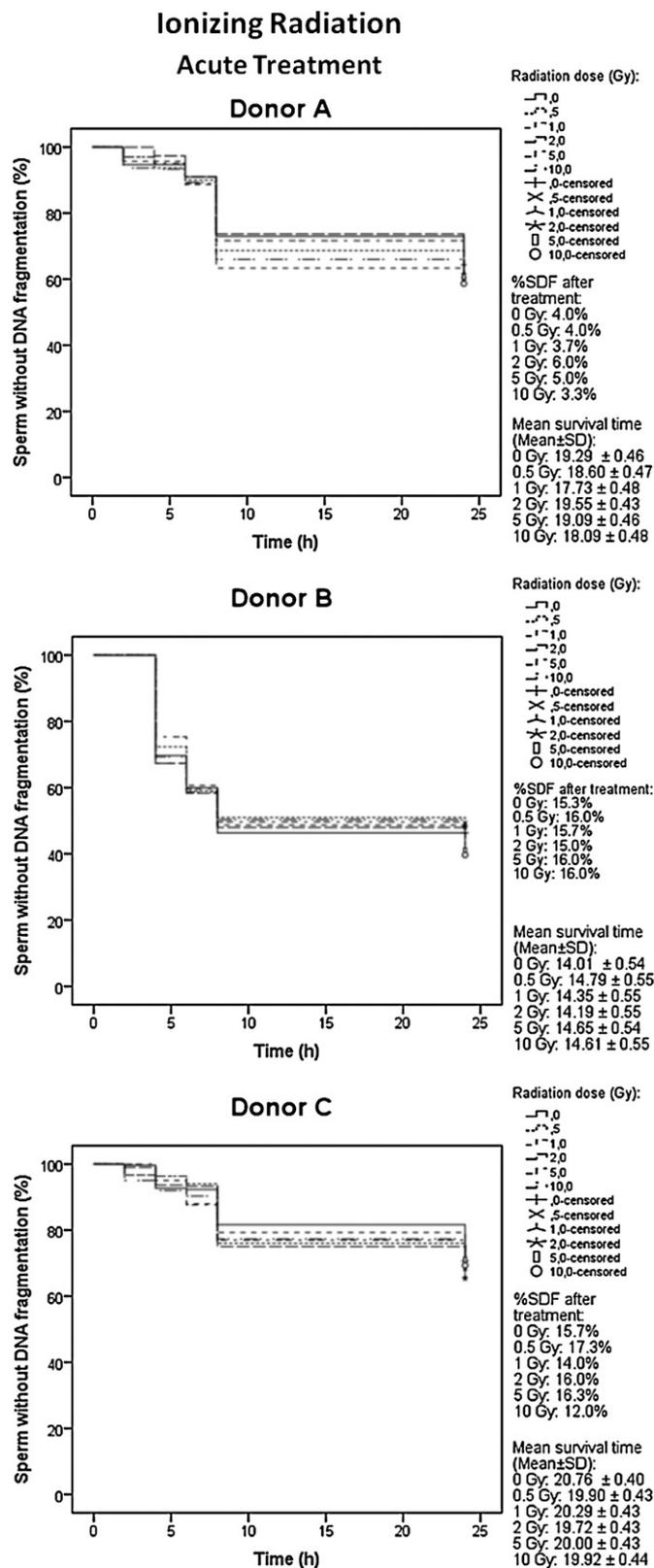


Fig. 1. Kaplan–Meier survival curves after exposure of sperm samples from donors A–C to increasing doses of X-rays, and incubated at 37 °C and at 45 °C for 24 h.

background SDF (T0) did not significantly increase compared to the control (pH 8). Nevertheless, the SDF rate from the remaining spermatozoa was significantly affected in both subjects ($p < 0.001$), although less strongly than in the samples chronically exposed to acidic pH. The rate of SDF of individual G was significantly greater than that from subject H, after acute exposure to pH 4 ($p < 0.001$).

3.4. Effect of NO

Chronic incubation with SNP for 24 h resulted in an extreme degradation of sperm DNA; most sperm were fragmented within a few hours, the intensity of the effect being similar irrespective of the SNP dose (Fig. 4). After subtracting the background SDF, the rate of SDF of all doses was found to vary significantly between individuals ($p < 0.001$). Immediately following only 5 min incubation with SNP, the %SDF increased in a dose dependent manner in all 3 donors. After subtracting this initially induced %SDF, the SDF dynamics of the remaining sperm was revealed to be clearly influenced by the previous acute SNP treatment, although it did not cause as a severe rate of SDF as that found in chronic treatment and it was found to be variable between donors; donor I showed a partial dose-effect, donor J only showed a significant alteration after the highest dose of SNP was used, whereas spermatozoa from donor K showed a similar rate of increase in SDF irrespective of the dose (Fig. 4).

4. Discussion

The results of this study have shown that the dynamic assessment of SDF is a useful tool in the evaluation and diagnosis of the effect of a range of reproductive toxicants on sperm DNA. Conventional assessment of SDF is usually limited to an initial static assessment but this approach may not elucidate the possible underlying or cryptic damage, that is only expressed when the sperm is dynamically evaluated with time [12]; this may be particularly the case when exposure to the toxicant is only transient or temporary or if the effects of the toxic agent are subtle.

4.1. Effect of ionizing radiation

Ionizing radiation interacts randomly with matter, ejecting electrons and producing reactive free radicals. After X-ray exposure, most of the damage to the biomolecule is indirect, mainly mediated by the hydroxyl radicals produced by the radiolysis of the water molecules close to the biomolecule. DNA damage induced by ionizing radiation results in single- and double-DNA strand breaks, a variety of damage to base, base-free sites, inter-strand DNA cross-links and DNA–protein cross-links [14,15]. This damage is usually detected, signaled and repaired through several interconnected and finely regulated pathways but if this damage remains unrepaired or misrepaired, it may result in mutations, chromosomal aberrations or even cell death through the activation of apoptosis [16,17]. Of course, if the DNA damage occurs in the sperm, it cannot be repaired before fertilization of the oocyte. Radiation exposure of the testis leads to cell death of radiosensitive subpopulations, mainly associated with intermediate spermatogonia. Despite this, the mature sperm appears to be a radioresistant cell, as demonstrated by irradiation in vitro [18] and in the mouse in vivo [19–21]; these studies did not detect significant DNA breakage even after exposure to 4 Gy X-rays when they were assessed with the sperm chromatin structure assay (SCSA) or comet assay. The sensitive DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization (DBD-FISH) procedure was only able to detect significant DNA breakage after using extremely high doses [22]. Our results confirm the high degree of radioresistance of mature spermatozoa, even when the SDF of spermatozoa are dynamically assessed. The extreme and

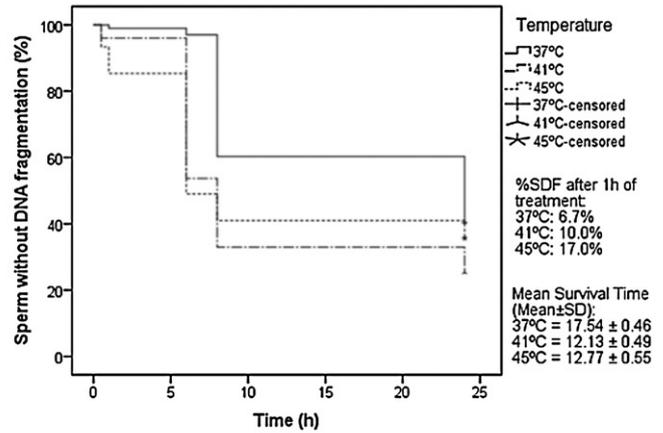
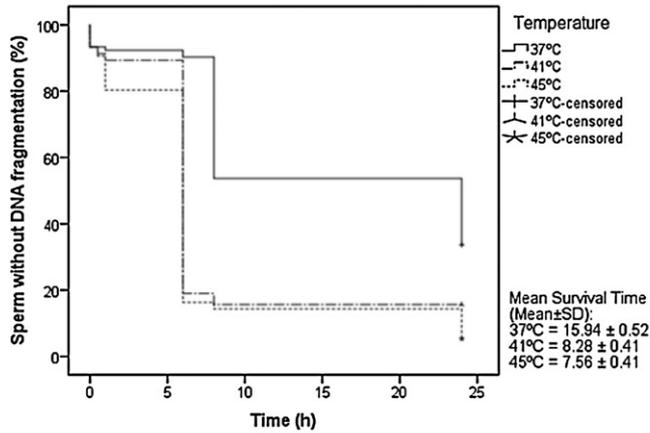
Temperature

Chronic Treatment

Acute Treatment

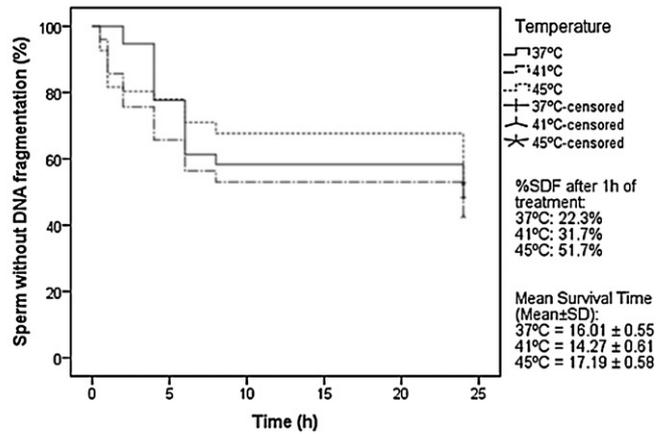
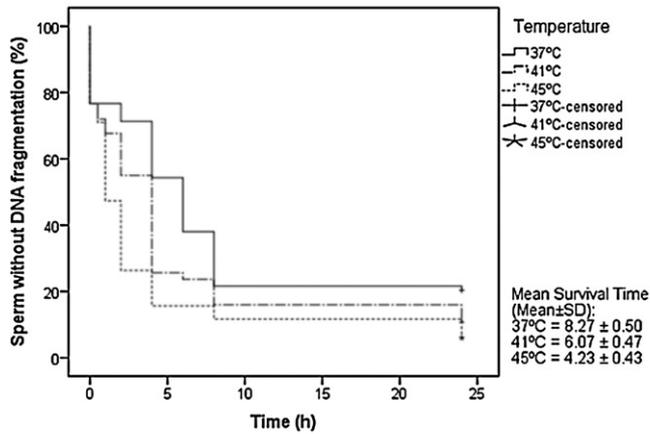
Donor D: 6.5% basal SDF

Donor D



Donor E: 23.33% basal SDF

Donor E



Donor F: 10.33% basal SDF

Donor F

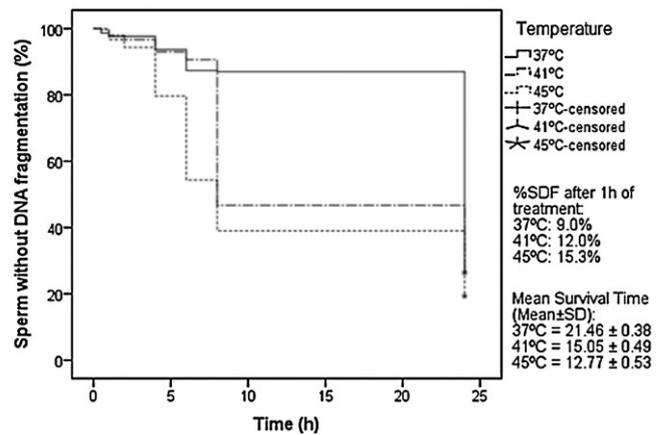
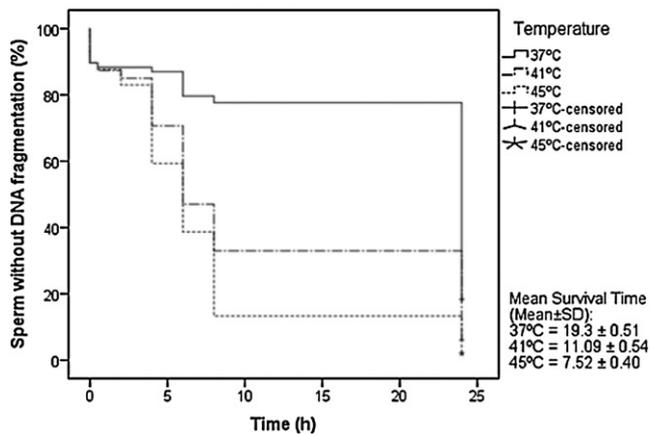


Fig. 2. Kaplan–Meier survival curves after exposure of sperm samples from donors D–F to 37 °C, 41 °C and 45 °C, chronically for 24 h, or at 41 °C and 45 °C acutely for 1 h and then 24 h at 37 °C.

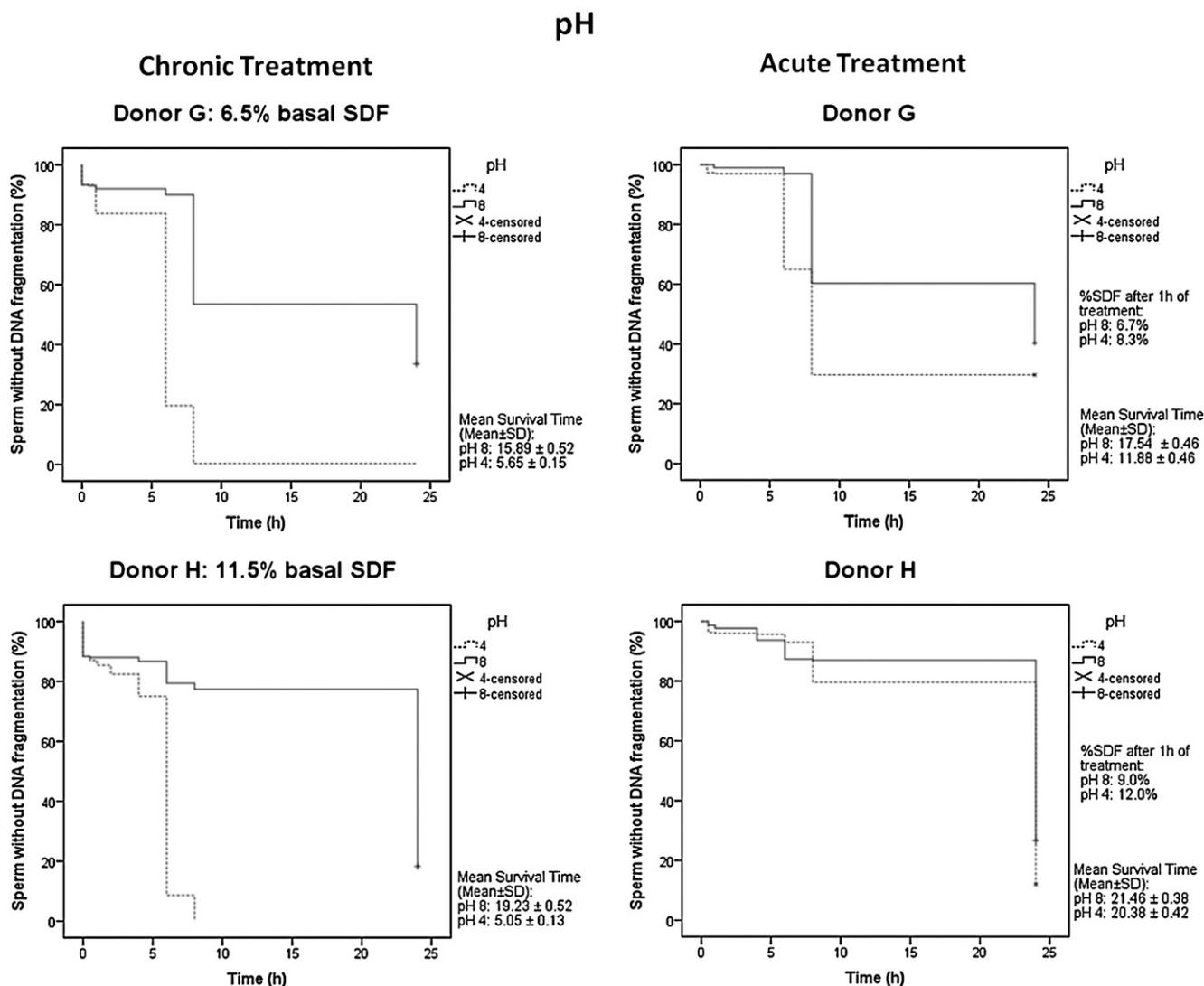


Fig. 3. Kaplan–Meier survival curves after exposure of sperm samples from donors G and H to pH 8 (original sample) and pH 4, chronically for 24 h, or acutely for 1 h and then 24 h in PBS at pH 7 at 37 °C.

tightly packed nature of the chromatin of the mature spermatozoon may reduce the water solvation layer surrounding the DNA strands, so that hydroxyl radical attack on DNA would be reduced; in fact, it is possible that this form of DNA packaging in the sperm nucleus may have evolved to provide a protective function.

4.2. Effect of hyperthermia

Heat is a pleiotropic damaging physical agent. It can alter the structure of certain heat-labile proteins that may aggregate after denaturation. Although it is unlikely to directly induce DNA breaks, it may interfere with the repair of DNA damage so that the resulting chromatin structure may be affected. Membranes can also be modified following hyperthermia, with a possible role of reactive oxygen/nitrogen species (ROS/NOS). These may induce sphingomyelin hydrolysis and ceramide formation, which in turn induces the JNK/SAPK cascade that is involved in heat-induced apoptotic cell death [23,24]. Specifically in the testis, high temperature is associated with an increase of ROS, which reacts quickly with substrates such as lipids, causing lipid peroxidation that affects sperm membranes [25]. In addition to these effects, the mitochondrial membrane can also be disrupted in spermatozoa and in germ

cells leading to the activation of pathways of programmed cell death [26,27].

The effect of hyperthermia on DNA integrity from sperm has been mostly studied *in vivo*, in animals, after testes–epididymal exposure. This was due to the well-known adverse influence of heat stress on spermatogenesis as spermatids are more sensitive to heat stress, resulting in increased levels of apoptosis and cell loss. Nevertheless, reports about a direct influence of heat stress on the DNA integrity specifically in the mature spermatozoa are difficult to find, especially in human. A study of heat stress in the stallion for which the testes were insulated for 48 h, detected damage to sperm chromatin starting only 10 days after heating, so that DNA damage was apparently not associated with epididymal transit [28]. In contrast, scrotal heating of the mouse to 40 °C for only 1 h resulted in a slight increase of sperm with fragmented DNA only 3 days after exposure [29]; these results were interpreted as an alteration of chromatin packaging of spermatozoa that were traversing the cauda and corpus epididymides, possibly mediated by alterations in epididymal function, as indicated by Paul et al. [30]. Elevated scrotal temperature for 48 h in bulls affected both epididymal and testicular sperm seen by an increased doubling of the %SDF (4–8%) within 3 days and a 5-fold increase after 12 days [31]. Banks et al. [32] exposed the mouse scrotum to mild heat stress (42 °C for 30 min) and showed

Nitric Oxide

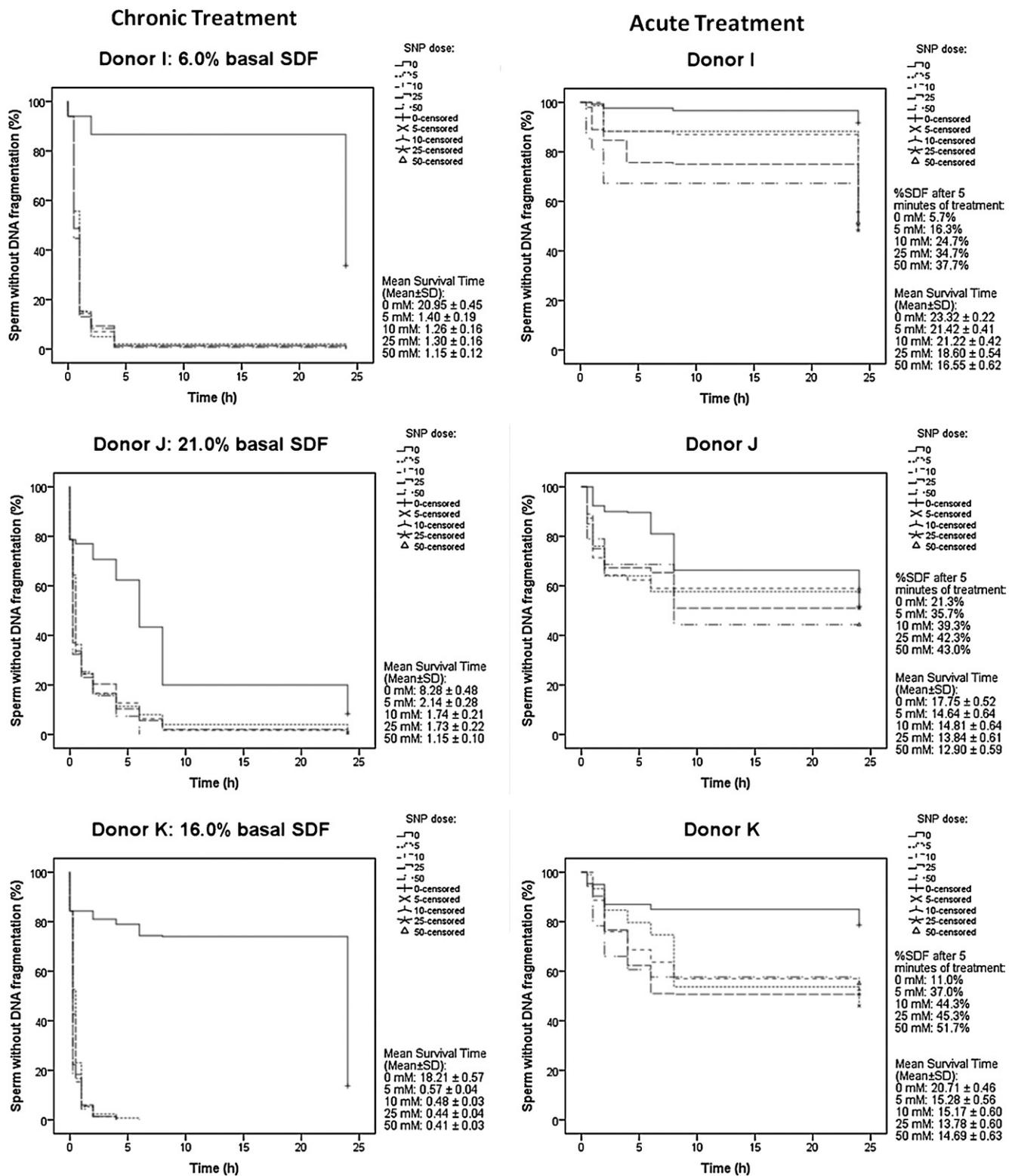


Fig. 4. Kaplan–Meier survival curves after exposure of sperm samples from donors I–K to increasing doses of SNP chronically for 24 h, or acutely for 5 min and then 24 h in PBS at 37 °C.

a significant increase in the SDF of mature spermatozoa from the epididymis. They showed that SDF increased from 5% to 30% after 1 h (the shortest time assayed) and then to 60% after 6 h and then decreasing followed by a decrease. In a similar model, Pérez-Crespo et al. [33] also obtained a similar increase in SDF, 6 h after scrotal

heating which represented the minimum time following the application of the heat stress. It has been suggested in these reports that sperm DNA damage could be a result of an unfavorable epididymal environment, due to enhanced oxidative stress by the increase in epididymal temperature.

To our knowledge, there is only one report about the effect of heat stress on DNA in mature human sperm; exposure *in vitro* to 40 °C for 4 h only affected DNA integrity in the fraction of spermatozoa associated with poor capacitation [34]. Our results clearly detected a significant SDF increase after 1 h exposure to elevated temperature. Moreover, the dynamic assay was efficient in revealing damage in spermatozoa that initially showed no DNA fragmentation following hyperthermia, the intensity of the impact being variable among the individuals. Our observations also indicated that these spermatozoa were experiencing some kind of heat-induced damage, which was latently expressed as DNA fragmentation. The dynamic sperm DNA fragmentation for humans is likely to have a range of application when examining for the effect of hyperthermia, especially in those males exposed to (1) hot environments such as bakers and welders [35], (2) extended periods in a sedentary position, such as professional drivers, (3) males who use tight-fitting underwear and (4) high-fever or pyrexia episodes [36].

4.3. Effect of acidic pH

Most enzymatic processes are influenced by pH, so pH variations should therefore have a major global effect on metabolic activity. Acidic media are known to reduce the percentage of motile sperm and decrease the straight-line velocity of spermatozoa [37]. To our knowledge, no data exist about SDF induction by pH variations. In this study, we have demonstrated that exposure to acidic pH can result in SDF. Although no significant SDF increase was evident immediately after transient exposure for 1 h, prolonged incubation for 24 h revealed a significant increase in SDF. Only the dynamic SDF assay was capable of detecting the detrimental effect of the transient acidic pH, thereby, again proving the efficacy of the dynamic approach for the detection of latent sperm DNA damage. It is possible that the decrease in SDF found in this study is mediated via oxidative induced injury to the sperm membrane. From a practical point of view, it must be taken into account that spermatozoa are normally subjected to pH stress after ejaculation in the vagina. Vaginal pH in the woman varies between 3.8 and 4.5, except in the menstrual phase, where it is close to 7 [38,39]. Our results suggest that acidic vaginal pH could have an adverse effect on sperm DNA integrity, even after a short-term contact of 1 h. Although SDF may be not initially be apparent, transient exposure to acid pH could lead to accelerated SDF kinetics with increased time in the female tract. It is likely that the acidic pH of the vagina may be important as a natural selective mechanism against sperm with DNA that is potentially susceptible to fragmentation, as some of these spermatozoa are likely to be fragmented when they reach the site of fertilization and thereby not participate in oocyte fertilization.

4.4. Effect of NO

Incubation of spermatozoa *in vitro* with different sources of ROS/NOS has resulted in an increase in DNA fragmentation [40–43]. In this study, the effect of oxidative stress on the SDF dynamics was evaluated by incubating spermatozoa with the NO donor SNP. NO is a small non-polar molecule which freely diffuses through membranes, so that it may act at a relatively long distance from its point of production. It is a versatile molecule that physiologically acts as a cellular messenger mediating various functions, including the regulation of blood flow, thrombosis, neural activity and immune response [44]. Nitric oxide may be produced in the spermatozoon during capacitation and the acrosome reaction [45]. While NO is in itself typically unreactive toward DNA, it is nevertheless unstable in the presence of molecular oxygen and forms nitrous anhydride (N₂O₃), which causes nitrosative stress. Moreover, NO also reacts with the superoxide anion (O₂^{-•}), yielding the powerful oxidizing

peroxynitrite (ONOO⁻). These reagents may induce DNA breaks and abasic sites in DNA and cause lesions in guanine residues [46]. SNP in blood, incubated *in vitro* at 37 °C, decomposes by 50% at 26.6 min and more than 90% by 2 h [47]. Accordingly, in this experiment, incubation with SNP produced a significant increase in SDF primarily within the initial 2 h exposure period. The different doses of SDF yielded similar kinetic damage responses in the three donors, suggestive of a saturation effect with time and which was apparent even with the lowest dose of SNP. Interestingly, a brief SNP exposure of only 5 min, irrespective of dose, produced a significant increase in SDF. After removal of SNP, the remaining spermatozoa that did not initially display DNA fragmentation, showed an increased SDF rate when evaluated dynamically. As was the case for exposure to hyperthermia and acidic pH, not all the damage induced by SNP was apparent immediately. NO may not only attack DNA but also produce oxidative damage to proteins and lipids. In fact, spermatozoa are particularly susceptible to the damage induced by excessive ROS because their plasma membranes contain large quantities of polyunsaturated fatty acids which readily experience lipid peroxidation by ROS, resulting in a loss of membrane integrity [48,49]; this could trigger a late DNA degradation apoptotic-like process. In fact, apart from induction of direct oxidative DNA damage, ROS have also been implicated in the regulation of specific cellular functions, acting as signaling molecules for apoptosis. Mitochondrial damage may also be implicated in sperm DNA fragmentation as these organelles are both a source and target of ROS, which mediate cytochrome *c* release resulting in the triggering of caspase activation [50]. It is clear that ROS overproduction may activate an apoptotic process, leading to DNA fragmentation [51] and it is important to reduce this damage during processing of sperm for manipulative procedures.

Many andrological pathologies involve oxidative stress in their pathophysiology, including inflammatory and infectious diseases. Moreover, excessive nitric oxide release within dilated spermatic veins has been identified in subfertile males with varicocele [52]. While an increase in the background SDF is evident in these patients immediately after ejaculation, we propose that the dynamic assay would be more sensitive at detecting further cryptic sperm damage that was not initially obvious by a static assessment. Our experiments also emphasize the importance with respect to the assessment of SDF following ejaculation, since different SDF values can be obtained at different times after DNA damage induction. We suggest that an abnormally accelerated SDF dynamic identified in a patient may be suspicious of cryptic sperm damage and may be completely independent of the background level of SDF initially recorded after the ejaculation.

5. Conclusions

Dynamic assessment of SDF after transient heat, pH stress and NO exposure has revealed the importance of incubating the sperm cell at 37 °C to allow the detection of cryptic damage that is not necessarily revealed by an initial static assessment; i.e. DNA longevity is affected and this may resemble a form of delayed apoptosis that occurs in somatic cells. While the X-ray doses used in this experiment were unable to induce SDF, there was a clear effect following hyperthermia, exposure to acidic pH and NO. The dynamic SDF assay may be of interest to reproductive genetic toxicologists in revealing not only immediate damage of sperm DNA but latent or cryptic damage that is only latently expressed. If dynamic assessment is used as the model to evaluate sperm DNA damage, the extent and incidence of DNA damage in patients associated with pyrexia, local heating, inflammation, infection and varicocele could be much higher than previously reported. We conclude that the sperm DNA fragmentation dynamic assay as demonstrated in this study is

ideally suited as a tool for those clinicians interested in elucidating the subtle and cryptic effects of reproductive toxicants and pathological conditions on sperm DNA integrity.

Sources of support

This study was supported by a contract with the Consejo de Seguridad Nuclear (CSN) from Spain and the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT: BFU2010-16738).

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- [1] J.L. Fernández, J.F. Vélez de la Calle, M. Tamayo, D. Cajigal, A. Agarwal, J. Gosálvez, Sperm DNA integrity and male infertility: current perspectives, *Arch. Med. Sci.* 5 (2009) 55–62.
- [2] M.R. Virro, K.L. Larson-Cook, D.P. Evenson, 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.* 81 (2004) 1289–1295.
- [3] R. Fernández-González, P.N. Moreira, M. Pérez-Crespo, M. Sánchez-Martín, M.A. Ramirez, E. Pericuesta, A. Bilbao, P. Bermejo-Alvarez, J.D. Hourcade, F. Rodriguez de Fonseca, A. Gutierrez-Adán, Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring, *Biol. Reprod.* 78 (2008) 761–772.
- [4] S.D. Perrault, R.J. Aitken, H.W.G. Baker, D.P. Evenson, G. Huszar, D.S. Irvine, I.D. Morris, R.A. Morris, W.A. Robbins, D. Sakkas, M. Spano, A.J. Wyrobek, Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion, in: B. Robaire, B.F. Hales (Eds.), *Advanced in Male Mediated Developmental Toxicity*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003, pp. 253–268.
- [5] D.P. Evenson, R. Wixon, Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®), *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (2005) 532–537.
- [6] A. García-Contreras, J. De Loera, C. García-Artiga, A. Palomo, J.A. Guevara, J. Herrera-Haro, C. López-Fernández, S. Johnston, J. Gosálvez, Elevated dietary intake of Zn-methionine is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar, *Reprod. Toxicol.* 31 (2011) 570–573.
- [7] J. Gosálvez, E. Cortés-Gutiérrez, R. Nuñez, J.L. Fernández, P. Caballero, C. López-Fernández, W.V. Holt, A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors, *Fertil. Steril.* 92 (2009) 1915–1919.
- [8] J. Gosálvez, C. Elva, C. López-Fernández, J.L. Fernández, P. Caballero, R. Nuñez, Sperm DNA fragmentation dynamics in fertile donors, *Fertil. Steril.* 92 (2009) 170–173.
- [9] R.E. Jackson, C.L. Borman, P.A. Hassun, A.M. Rocha, E.L. Motta, P.C. Serafini, G.D. Smith, Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation, *Fertil. Steril.* 94 (2010) 2626–2630.
- [10] R. Matsuura, T. Takeuchi, A. Yoshida, Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa, *Asian J. Androl.* 12 (2010) 753–759.
- [11] J. Gosálvez, C. López-Fernández, J.L. Fernández, A. Gouraud, W.V. Holt, Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from 11 species, *Mol. Reprod. Dev.* 78 (2011) 951–961.
- [12] J. Gosálvez, J. de la Torre, C. López-Fernández, L. Pérez-Gutiérrez, L. Ortega, P. Caballero, R. Nuñez, DNA fragmentation dynamics in fresh versus frozen thawed plus gradient-isolated human spermatozoa, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 56 (2010) 7–36.
- [13] J.L. Fernández, L. Muriel, V. Goyanes, E. Segrelles, J. Gosálvez, M. Enciso, M. LaFromboise, C. De Jonge, Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test, *Fertil. Steril.* 84 (2005) 833–842.
- [14] C. Von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, London, 1987.
- [15] P. O'Neill, E.M. Fielden, Primary radical process in DNA, *Adv. Radiat. Biol.* 17 (1993) 53–120.
- [16] K.K. Khanna, S.P. Jackson, DNA double strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, *Nat. Genet.* 27 (2001) 247–254.
- [17] H.L. Borges, R. Linden, J.Y.J. Wang, DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system, *Cell Res.* 18 (2008) 17–26.
- [18] G. Haines, B. Marples, P. Daniel, I. Morris, DNA damage in human and mouse spermatozoa after *in vitro*-irradiation assessed by the comet assay, *Adv. Exp. Med. Biol.* 444 (1998) 79–91.
- [19] B.L. Sailer, L.K. Jost, K.R. Erickson, M.A. Tajiran, D.P. Evenson, Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure, *Environ. Mol. Mutagen.* 25 (1995) 23–30.
- [20] G.A. Haines, J.H. Hendry, C.P. Daniel, I.D. Morris, Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation, *Biol. Reprod.* 67 (2002) 854–861.
- [21] E. Cordelli, A.M. Fresegna, G. Letter, P. Eleuteri, M. Spanò, P. Villani, Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Radiat. Res.* 160 (2003) 443–445.
- [22] J.L. Fernández, F. Vázquez-Gundín, A. Delgado, V. Goyanes, J. Ramiro-Díaz, J. de la Torre, J. Gosálvez, DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features, *Mutat. Res.* 453 (2000) 77–82.
- [23] T.K. Pandita, S. Pandita, S.R. Bhaumik, Molecular parameters of hyperthermia for radiosensitization, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expres.* 19 (2009) 235–251.
- [24] T. Tomita, Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death, *J. Radiat. Res.* 51 (2010) 493–501.
- [25] A.K. Bansal, G.S. Bilaspuri, Oxidative stress alters membrane sulfhydryl status, lipid and phospholipid contents of crossbred cattle bull spermatozoa, *Anim. Reprod. Sci.* 104 (2007) 398–404.
- [26] S.B. Sleight, P.V. Miranda, N.W. Plaskett, B. Maier, J. Lysiak, H. Scrabble, J.C. Herr, P.E. Visconti, Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation, *Biol. Reprod.* 73 (2005) 721–729.
- [27] P.F. Silva, B.M. Gadella, B. Colenbrander, B.A. Roelen, Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage, *Theriogenology* 67 (2007) 609–619.
- [28] C.C. Love, R.M. Kenny, Scrotal stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion, *Biol. Reprod.* 60 (1999) 615–620.
- [29] B.L. Sailer, L.J. Sarkar, J.A. Bjordahl, L.K. Jost, D.P. Evenson, Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure, *J. Androl.* 18 (1997) 294–301.
- [30] C. Paul, A.A. Murray, N. Spears, P.T.K. Saunders, A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocyst in mice, *Reproduction* 136 (2008) 73–84.
- [31] D.S. Karabinus, C.J. Vogler, R.G. Saalke, D.P. Evenson, Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls, *J. Androl.* 18 (1997) 549–555.
- [32] S. Banks, S.A. King, P.T.K. Saunders, Impact of a mild heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa, *Reproduction* 129 (2005) 505–514.
- [33] M. Pérez-Crespo, B. Pintado, A. Gutiérrez-Adán, Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice, *Mol. Reprod. Dev.* 75 (2008) 40–47.
- [34] S.L. Mann, W.C. Patton, A. King, P.J. Cahn, Comparative genomic hybridization analysis of sperm DNA apoptosis after exposure to heat shock, *J. Assist. Reprod. Genet.* 19 (2002) 195–200.
- [35] P. Thonneau, L. Bujan, L. Multigner, R. Mieuisset, Occupational heat exposure and male fertility: a review, *Hum. Reprod.* 13 (1998) 2122–2125.
- [36] M. Sergerie, R. Mieuisset, F. Croute, M. Daudin, L. Bujan, High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness, *Fertil. Steril.* 88 (2007) e1–e7.
- [37] G. Arienti, E. Carlini, A. Nicolucci, E.V. Cosmi, F. Santi, C.A. Palmerini, The motility of human spermatozoa as influenced by prostasomes at various pH levels, *Biol. Cell* 91 (1999) 51–54.
- [38] G.B. Melis, M.T. Ibbá, B. Steri, P. Kotsonis, V. Matta, A.M. Paoletti, Role of pH as a regulator of vaginal physiological environment, *Minerva Ginecol.* 52 (2000) 111–121.
- [39] A. Fernández-Cid, M. Fernández-Cid, El pH vaginal y su importancia clínica, *Ginecol. Obstet. Clin.* 5 (2004) 75–80.
- [40] R.J. Aitken, E. Gordon, D. Harkiss, J.P. Twigg, P. Milne, Z. Jennings, S.D. Irvine, Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa, *Biol. Reprod.* 59 (1998) 1037–1046.
- [41] S. Lopes, A. Jurisikova, J.G. Sun, R.F. Casper, Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa, *Hum. Reprod.* 13 (1998) 896–900.
- [42] A. Agarwal, R.A. Saleh, M.A. Bedaiwy, Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction, *Fertil. Steril.* 79 (2003) 829–843.
- [43] R. Santiso, M. Tamayo, J. Gosálvez, M. Meseguer, N. Garrido, J.L. Fernández, Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm, *Fertil. Steril.* 93 (2010) 314–318.
- [44] S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 43 (1991) 109–142.
- [45] M. Belén-Herrero, C. Gagnon, Nitric oxide: a novel mediator of sperm function, *J. Androl.* 22 (2001) 349–356.
- [46] S. Burney, J.L. Caulfield, C. Niles, J.S. Whishnok, S.R. Tannenbaum, The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite, *Mutat. Res.* 424 (1999) 37–49.
- [47] C.J. Vesey, M. Stringer, P.V. Cole, Decay of nitroprusside. I: *in vitro*, *Br. J. Anaesth.* 64 (1990) 696–703.
- [48] J.G. Alvarez, J.C. Touchstone, L. Blasco, B.T. Storey, Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity, *J. Androl.* 8 (1987) 338–348.
- [49] R.J. Aitken, D. Harkiss, D. Buckingham, Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function, *J. Reprod. Fertil.* 98 (1993) 257–265.

- [50] M. Giorgio, E. Migliaccio, F. Orsini, D. Paolucci, M. Moroni, C. Contursi, G. Pelliccia, L. Luzzi, S. Minucci, M. Marcaccio, P. Pinton, R. Rizzuto, P. Bernardi, F. Paolucci, P.G. Pellicci, Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis, *Cell* 122 (2005) 221–233.
- [51] H.U. Simon, A. Haj-Yehia, F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis* 5 (2000) 415–418.
- [52] E. Ozbek, Y. Turkoz, R. Gokdeniz, M. Davarci, F. Ozugurlu, Increased nitric oxide production in the spermatic vein of patients with varicocele, *Eur. Urol.* 37 (2000) 172–175.