



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**“Estudio del daño del ADN espermático y su relación  
con la infertilidad masculina”**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

**AUTOR**

Cristian Roberto ALVAREZ SEDÓ

**ASESOR**

Dra. Silvia SUAREZ CUNZA

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Alvarez C. Estudio del daño del ADN espermático y su relación con la infertilidad masculina [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2020.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	0000-0002-2407-8190
DNI o pasaporte del autor	40156347
Código ORCID del asesor	0000-0001-7848-0102
DNI o pasaporte del asesor	08043525
Grupo de investigación	NO APLICA
Agencia financiadora	NO APLICA
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	VIAMONTE 1432 C1055 ABB LATITUD: -34,60069 LONGITUD: -58,387274  Buenos Aires - Argentina
Año o rango de años que la investigación abarcó	2010-2019
Disciplinas OCDE	1.06.03 -- Bioquímica, Biología molecular

Nota: tomar en cuenta la forma de llenado según las precisiones colocas en la web.  
[https://sisbib.unmsm.edu.pe/archivos/documentos/recepcion\\_investigacion/Hoja%20de%20metadatos%20complementarios\\_30junio.pdf](https://sisbib.unmsm.edu.pe/archivos/documentos/recepcion_investigacion/Hoja%20de%20metadatos%20complementarios_30junio.pdf)



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú. Decana de América



Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado  
Sección Maestría

### ACTA DE GRADO DE MAGISTER

En la ciudad de Lima, a los 12 días del mes de octubre del año dos mil veinte siendo las 11:00 am, bajo la presidencia de la Dra. Doris Virginia Huerta Canales con la asistencia de los Profesores: Dra. Martha Esther Valdivia Cuya (Miembro), Dr. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez (Miembro), y la Dra. Silvia Suárez Cunza (Asesora); el postulante al Grado de Magíster en Bioquímica, Bachiller en Ciencias Biológicas, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **“ESTUDIO DEL DAÑO DEL ADN ESPERMÁTICO Y SU RELACIÓN CON LA INFERTILIDAD MASCULINA”** con el fin de optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **A EXCELENTE 20**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA** al postulante. **Cristian Roberto Alvarez Sedó**

Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo la 12:30 pm, se da por concluido el acto académico de sustentación.

**Dra. Martha Esther Valdivia Cuya**  
Profesora Principal  
**Miembro**

**Dr. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez**  
Profesor Asociado  
**Miembro**



**Dra. Silvia Suárez Cunza**  
Profesora Principal  
**Asesor**

**Dra. Doris Virginia Huerta Canales**  
Profesora Principal  
**Presidente**

La presente tesis ha sido parte de un proyecto de investigación titulado: «IMPACTO DEL DAÑO DEL ADN ESPERMÁTICO SOBRE LA FERTILIDAD MASCULINA». Así mismo, resultados preliminares han sido presentados en congresos internacionales de la especialidad.

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgencita

A mi mamá Esperanza, mi papá Ricardo, y mis hermanos Ricardo y María del Socorro, por todo el apoyo, la confianza y el amor recibido desde siempre. A mi gran familia, en especial a mis tías Olimpia, Amelia y Meche. A mis primos que siempre me han apoyado y acompañado en todo momento.

Al amor de mi vida, mi esposa Heydyta, por ser mi inspiración y fortaleza, mi todo. Gracias mi cielito por siempre incentivar y motivarme a seguir creciendo. Por nosotros.

A la familia Uriondo: Sra. Irma, Sr. Carlos, Oliver, Darinka y Sebastián, que siempre me han apoyado y acompañado, gracias por permitirme ser parte de la familia.

A la Dra. Silvia Suarez Cunza por aceptar ser mi asesora en esta tesis, gracias por todo su tiempo, apoyo y aportes. Junto a las Dras. Doris Huerta y Martha Valdivia han sido parte fundamental de mi formación de pre y post grado. Gracias por todo.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por darme la formación integral necesaria en mi carrera de biólogo.

## ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- FIV: Fecundación in vitro
- ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoide
- EO: Estrés oxidativo
- *IF*: inmunofluorescencia
- *ICC*: inmunocitoquímica
- *WB*: Técnica de western blot
- *ECL*: Químico luminiscencia
- *TUNEL*: Del inglés “Terminal dUTP Nick-End Labeling”
- 8-OHdG: “8 Hidroxi Deoxi Guanosina”
- SDS-PAGE: Del inglés “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”, gel de electroforesis en poliacrilamida en condiciones reductoras por dodecil sulfato de sodio.
- Surv: Proteína Survivin
- AZF: Factor de azoospermia
- DTT: ditioneitol
- PVDF. fluoruro de polivinilideno

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN
  - 1.1 Situación problemática
  - 1.2 Formulación del problema
  - 1.3 Justificación
  - 1.4 Objetivos de la investigación
    - 1.4.1 Objetivos específicos
  
2. MARCO TEÓRICO
  - 2.1 Antecedentes del problema
  - 2.2 Bases teóricas
    - 2.2.1 Infertilidad masculina
    - 2.2.2 El espermatozoide humano y su ADN
    - 2.2.3 Daño del ADN espermático
      - 2.2.3.1 Mecanismos que inducen daño en el ADN espermático
      - 2.2.3.2 Compactación de la cromatina y su susceptibilidad al daño del ADN
      - 2.2.3.3 El estrés oxidativo como inductor del daño en el ADN espermático
      - 2.2.3.4 Métodos de detección del daño del ADN espermático
  
3. METODOLOGÍA
  - 3.1 Tipo y diseño de investigación
  - 3.2 Población del estudio
  - 3.3 Tamaño de la muestra
  - 3.4 Selección de la muestra
    - 3.4.1 Criterios de inclusión
    - 3.4.2 Criterios de exclusión
  - 3.5 Procesamiento de las muestras de semen
  - 3.6 Estudio de la calidad seminal y daño del ADN espermático
    - 3.6.1 Movilidad espermática
    - 3.6.2 Morfología espermática
    - 3.6.3 Daño oxidativo
      - a) Evaluación y cuantificación de la peroxidación lipídica en la membrana espermática en espermatozoides humanos
      - b) Determinación y semi-cuantificación de 8OHdG y p53 por SDS-PAGE y Western blot
    - 3.6.4 Evaluación de la apoptosis
      - a) Evaluación y cuantificación de la externalización de la fosfatidil serina en espermatozoides humanos
      - b) Determinación y cuantificación de caspasa 3 activa en espermatozoides humanos
    - 3.6.5 Estabilidad del núcleo espermático

- a) Detección y cuantificación de la fragmentación del ADN espermático (TUNEL) en espermatozoides humanos
  - b) Detección y cuantificación del estado de compactación de la cromatina
- 3.7 Infertilidad masculina
    - 3.7.1 Datos clínicos de infertilidad masculina
    - 3.7.2 Calidad embrionaria y embarazo por el factor masculino
  - 3.8 Análisis estadístico
4. RESULTADOS
- 4.1 Resultados demográficos
  - 4.2 Resultados sobre la calidad seminal y daño del ADN espermático
  - 4.3 Resultados de los estudios de la infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES
- 5.1 Discusión
  - 5.2 Conclusiones
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
7. ANEXOS
- I. Modelo de consentimiento informado
  - II. Hoja de recolección de datos clínicos y calidad seminal
  - III. Modelo de historia clínica

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Tasa de embarazo esperada relacionada al tiempo de búsqueda.
- Cuadro 2. Distribución de causas de infertilidad.
- Cuadro 3. Lista de factores etiológicos involucrados en la infertilidad y sub-fertilidad por factor masculino.
- Cuadro 4. Distribución de los trastornos de infertilidad masculina.
- Cuadro 5. Valores de referencia para los parámetros seminales normales.
- Cuadro 6. Principios / Ventajas y desventajas de los diferentes métodos para medir la fragmentación del ADN espermático.
- Cuadro 7. Prevalencia (Número de casos y porcentajes) de causas de infertilidad en la población de estudio.
- Cuadro 8. Distribución etaria de los casos de varones infértiles incluidos en el estudio.
- Cuadro 9. Tabla de distribución (Número de casos y porcentajes) de los años de infertilidad que cursaron los pacientes incluidos en el estudio.
- Cuadro 10. Resumen de los valores de los parámetros seminales en la muestra entera.
- Cuadro 11. Resumen de los valores de las variables evaluadas por microscopía de fluorescencia (Anexina V, peroxidación lipídica – BODIPY, caspasa 3 activa, naranja de acridina y TUNEL) en la muestra entera y post gradiente.
- Cuadro 12. Comparación de los marcadores, determinados mediante Western Blot, presentes en las fracciones de muestra entera (ME) vs. post gradiente (MG).
- Cuadro 13. Comparación de las variables: Anexina V, CC3, TUNEL y BODIPY) respecto a la edad (mayor o menor de 43 años).
- Cuadro 14. Comparación de las variables seminales y la fragmentación del ADN respecto a la fertilidad.
- Cuadro 15. Comparación de los parámetros seminales y fragmentación del ADN espermático entre pacientes infértiles con o sin comorbilidades.
- Cuadro 16. Resultados clínicos dentro de una población de varones infértiles que realizaron tratamientos de reproducción asistida con óvulos donados.
- Cuadro 17. Comparación de los niveles de daño del ADN y apoptosis en embriones detenidos provenientes de pacientes infértiles con valores de fragmentación del ADN mayor o menor a 15%.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-gónada del sistema reproductor masculino.

Figura 2.- Representación esquemática de corte transversal del túbulo seminífero.

Figura 3.- Organización y remodelación de la cromatina espermática durante la espermatogénesis.

Figura 4.- Modelo de la estructura de la cromatina espermática humana.

Figura 5.- Principales mecanismos que inducen al daño en el ADN del espermatozoide durante su producción o tránsito.

Figura 6.- Los factores implicados en la etiología de daño del ADN en la línea germinal masculina.

Figura 7.- Visualización de un extendido de muestra seminal para la observación de la morfología espermática según el criterio de Kruger.

Figura 8.- BODIPY 581/591 C11. Espermatozoides humanos marcados con BODIPY

Figura 9.- Espermatozoides humanos marcados con Anexina V/ Ioduro de propidio

Figura 10.- Ensayo Caspasa 3 activa + TUNEL.

Figura 11.- Ensayo TUNEL.

Figura 12. Marcación con naranja de acridina.

Figura 13.- Estadios de desarrollo evaluados durante el cultivo in vitro de embriones humanos.

Figura 14.- Imágenes de microscopía confocal para la detección de Surv y TUNEL.

Figura 15.- Imágenes de microscopía de fluorescencia para la detección de Surv y caspasa 3 activa en embriones detenidos durante el desarrollo in vitro.

Figura 16.- Prevalencia de causas de infertilidad en la población bajo estudio.

Figura 17.- Estratificación etaria en la población estudiada.

Figura 18.- Distribución de la duración de años de infertilidad en la población.

Figura 19.- Comparación de los parámetros de movilidad (% a+b) (Mov) y concentración (Cc) (millones/mL) en la muestra entera (ME) vs. la muestra post gradiente (MG).

Figura 20.- Comparación de los marcadores (Anexina V, BODIPY, CC3, naranja de acridina y TUNEL) entre la ME vs MG evaluados por microscopía de fluorescencia.

Figura 21.- Representación de una muestra (N=4) del estudio de Western blot para p53, 8 OHDG y Caspasa 3 activa en muestra entera (ME) vs. post-gradiente (MG).

Figura 22.- Comparación de los marcadores (Anexina V, BODIPY, CC3, naranja de acridina y TUNEL) entre la ME vs MG. Evaluados por western blot.

Figura 23.- Correlación de los marcadores, Anexina V, BODIPY y TUNEL con la variable edad en la fracción de muestra entera (ME).

Figura 24.- Correlación de los marcadores, Anexina V, BODIPY y TUNEL con la variable edad en la fracción de muestra post gradiente (MG).

Figura 25.- Correlación entre los marcadores p53, 8OH y CC3 con la variable edad en la fracción de muestra entera (ME).

Figura 26.- Correlación entre los marcadores p53, 8OH y CC3 con la variable edad en la fracción de muestra post gradiente (MG).

Figura 27.- Correlación de los marcadores, Anexina V, BODIPY y TUNEL vs. la morfología estricta de Kruger en la muestra entera (ME) (A) y la movilidad (B).

Figura 28.- Correlación entre los marcadores p53, 8OH y CC3 vs. la morfología estricta de Kruger en la muestra entera (ME) (A) y la movilidad (B).

Figura 29.- Porcentaje de Anexina, BODIPY y TUNEL en los grupos etarios definidos.

Figura 30.- Porcentaje de los marcadores p53, 8OH y CC3 en relación a los grupos etarios establecidos.

Figura 31.- Gráfica de curva ROC para establecer el valor de corte de la fragmentación del ADN espermático entre poblaciones de varones fértiles e infértiles.

Figura 32.- Gráfica de sensibilidad y especificidad de acuerdo al valor de corte de la fragmentación del ADN espermático (15%) entre poblaciones de varones fértiles e infértiles.

Figura 33.- Comparación de los niveles de fragmentación del ADN espermático en una población de varones infértiles que presentaron comorbilidades médicas.

Figura 34.- Análisis de correlación entre la fragmentación del ADN espermático y la tasa de blastulación.

## RESUMEN

La valoración de la calidad espermática ha sido siempre de gran importancia respecto al diagnóstico de pareja infértil. Las características seminales básicas han permitido tradicionalmente definir el potencial reproductivo del hombre, sin embargo, algunas veces es insuficiente, por lo que se ha propuesto que la integridad del ADN espermático podría ser importante al momento de valorar la capacidad reproductiva del hombre. El objetivo de esta tesis fue demostrar si existe una asociación entre el daño del ADN y la fertilidad del hombre. Para este propósito se incluyeron varones infértiles e fértiles, se evaluaron los parámetros seminales mediante lo establecido por la OMS, y se cuantificó en la muestra entera y post gradiente de centrifugación: los niveles de apoptosis (Anexina V y caspasa 3 activa), daño oxidativo (BODIPY y 8-OHdG), y la estabilidad del núcleo espermático (TUNEL y Naranja de Acridina). Se emplearon técnicas de inmunofluorescencia y western blot. Así mismo, se buscó determinar la asociación entre el daño del ADN vs. la calidad seminal, calidad embrionaria, embarazo y la presencia de comorbilidades clínicas. Se demostró una asociación negativa entre la fragmentación del ADN y la fertilidad del hombre (lograr el embarazo), estableciéndose un valor del corte de 15%. Se determinó una correlación negativa y significativa entre la fragmentación del ADN-daño oxidativo y la baja movilidad espermática, alteración de la morfología espermática e inadecuada calidad embrionaria. Se estableció una correlación positiva con la edad del varón, por encima de los 43 años, se evidenciaron diferencias significativas. La presencia de comorbilidades, tales como, síndrome metabólico y pacientes tratados por trastornos de ansiedad, presentaron un mayor daño del ADN espermático. Todos los parámetros respecto al daño del ADN, estrés oxidativo y apoptosis disminuyeron en la población de espermatozoides móviles post gradiente en comparación a la muestra entera. Se concluye que existe una asociación inversa entre el daño del ADN a nivel testicular con la fertilidad masculina mediado principalmente por el estrés oxidativo y se acentúa con la edad. El estudio de fragmentación del ADN deber ser considerado como un marcador útil para valorar la capacidad reproductiva del hombre.

Palabras clave: infertilidad, espermatozoide, núcleo, ADN, oxidativo

## **ABSTRACT**

The assessment of sperm quality has always been an important issue respect to infertility. The basic seminal characteristics have traditionally allowed to determine the reproductive potential of man, however, it is sometimes insufficient, so it has been proposed that the integrity of sperm DNA could be important to assess male fertility. The objective of this thesis was to demonstrate whether there is an association between DNA damage and male fertility. For this purpose, both infertile and fertile males were included, seminal parameters were evaluated by WHO guidelines, and were quantified (neat sample or post-centrifugation gradient): apoptosis levels (Annexin V and cleaved caspase 3), oxidative damage (BODIPY and 8-OHdG), and the stability of the sperm nucleus (TUNEL and Acridine Orange). Immunofluorescence and western blot techniques were used. Likewise, we sought to determine the association between DNA damage vs. sperm and embryo quality, pregnancy and the presence of clinical co-morbidities. A negative association was demonstrated between DNA fragmentation and male fertility (pregnancy), establishing a cut-off value of 15%. A negative and significant correlation between DNA fragmentation - oxidative damage and low sperm mobility, impair of sperm morphology and inadequate embryonic quality was determined. A positive correlation was established with male's age, above 43 years, significant differences were evidenced. The presence of co-morbidities, such as metabolic syndrome and patients treated for anxiety disorders, showed greater sperm DNA damage. All parameters regarding to DNA damage, oxidative stress and apoptosis decreased in the post-gradient motile sperm population compared to the neat sample. It is concluded that there is an inverse association between DNA damage at testicular level with male fertility mediated mainly by oxidative stress and accentuated with age. The study of DNA fragmentation should be considered as a useful marker to assess the male reproductive capacity.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Situación problemática

El proceso de fertilización en mamíferos, incluyendo al hombre, y el consiguiente desarrollo embrionario depende en gran parte de la integridad inherente del ADN espermático. En la actualidad, debido a aspectos sociales, psicológicos y económicos, existe la necesidad primaria de distinguir, clínicamente, aquellos varones fértiles de aquellos infértiles, con el objetivo de poder orientar a aquellos varones infértiles, a cerca de la(s) causa(s) que podrían estar generando esta condición. Si bien es cierto, que los parámetros seminales convencionales han sido utilizados por muchos años para este objetivo, al parecer no siempre pueden predecir la fertilidad con certeza. En general, se ha considerado que el 30-35% de las causas de infertilidad son debidas a un factor masculino puro, y otro 30% debido a un factor masculino sumado a un factor femenino. Así, en más de la mitad de las parejas que no pueden concebir un hijo en un periodo de un año de búsqueda, se puede deber a un factor masculino.

El análisis de semen convencional, conocido como espermatoograma, resulta ser de manera inicial muy importante, sin embargo, en algunos casos puede resultar insuficiente para ejecutar una correcta y detallada determinación del estado de fertilidad de una pareja; en este sentido, desde hace varios años se ha intentado sumar pruebas al espermatoograma con el objetivo de ayudar al diagnóstico del factor masculino, en este sentido, el sumar una prueba como la integridad del ADN espermático podría brindar

mayor respaldo clínico al diagnóstico de infertilidad. En la actualidad, tanto los especialistas en medicina reproductiva y andrología buscan identificar factores determinantes en la incapacidad de lograr el embarazo o en poder sostenerlo hasta el nacimiento de un niño sano.

## **1.2 Formulación del problema**

¿Existe correlación positiva entre el daño espermático y la infertilidad masculina?

## **1.3 Justificación**

Los espermatozoides de hombres infértiles pueden poseer diversos defectos morfológicos y/o funcionales, entre ellos podemos mencionar a las alteraciones nucleares: estructura cromatínica anormal, microdeleciones cromosómicas (específicamente en el cromosoma Y), aneuploidías, rupturas en las hebras del ADN (daño o fragmentación del ADN). El daño en el ADN espermático puede ocurrir durante la formación o en el transporte de dichas células.

En los últimos años, con la modificación de los hábitos de vida, se ha producido un incremento de ciertos factores intrínsecos y extrínsecos que pueden afectar la fertilidad masculina, esto ha generado que el cuerpo médico especialista en medicina reproductiva, se interese por realizar una profunda anamnesis, y así, analizar las causas de la infertilidad masculina en un contexto más amplio. La justificación de este proyecto de investigación apunta a aportar evidencia de factores intrínsecos/extrínsecos asociados al daño del ADN espermático, y fundamentar la utilidad de este marcador en el diagnóstico de la infertilidad masculina, y, por lo tanto, proponerlo como un marcador de gran utilidad en el diagnóstico de la pareja infértil. De encontrarse esta asociación, el estudio de este marcador, podría ayudar al diagnóstico rápido y certero, y por lo tanto establecer el tratamiento adecuado para los pacientes.

## **1.4 Objetivo de la investigación**

Establecer la correlación entre el daño del ADN espermático y la condición de infertilidad masculina.

### ***1.4.1 Objetivos específicos***

Caracterizar el daño del ADN espermático.

Identificar las condiciones clínicas de infertilidad masculina.

Analizar la correlación entre las variables del daño del ADN espermático y las condiciones de infertilidad masculina.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Antecedentes del problema**

En el marco de la fertilidad, se conoce que alrededor del 30% de infertilidad es a consecuencia del factor masculino puro. Años atrás, el examen físico y la evaluación del semen (morfología, movilidad, concentración, etc.) han sido aspectos considerados en la toma de conductas médicas dentro de los tratamientos de reproducción asistida (tratamientos establecidos para ayudar a parejas a lograr el embarazo por técnicas de inseminación intrauterina o fecundación in vitro). Sin embargo, al parecer estos estudios básicos pueden considerarse insuficientes en casos particulares. Al respecto, incluso con la aparición del ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) como tratamiento frente al factor masculino severo, aún se puede evidenciar un elevado número de fallas en los ciclos de fecundación in vitro (FIV) con esta metodología, esto sugiere que podrían existir otros factores con implicancias clínicas que estarían más allá de lo usualmente estudiado. En este sentido, el estudio de la fragmentación del ADN espermático aportó nuevas expectativas en la búsqueda de explicación de la infertilidad masculina, así como a las fallas repetidas de FIV-ICSI (Sakkas & Alvarez, 2010, Agarwal A, Majzoub A, Esteves S, Ko E, Ramasamy R, Zini A, 2016).

Cuando una pareja inicia los estudios para evaluar su capacidad fértil, la evaluación seminal convencional es parte de este algoritmo de estudio. Durante la década de los 80s y 90s, surgen las pruebas de funcionalidad espermática, las cuales tuvieron como objetivo evaluar si los espermatozoides podían ser capaces de realizar acciones específicas, tales como, capacitación, reacción acrosómica y la penetración de la zona pelúcida. Sin embargo, con el advenimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), como herramienta para el factor espermático severo, estas pruebas de funcionalidad espermática han caído en desuso y en la mayoría de los laboratorios de andrología-embriología ya no se usan. Estas pruebas implicaban en su mayoría de casos el uso de metodologías de biología molecular, así como ovocitos de ratón o hámster para demostrar si un espermatozoide era capaz de penetrar las células del cúmulus, penetrar la zona pelúcida, o unirse a la membrana del ovocito y descondensar su ADN, sin embargo, todos estos aspectos son omitidos cuando se usa la técnica de ICSI.

En la última década, los investigadores que trabajan en el área de la infertilidad, principalmente masculina, han centrado su atención en la arquitectura molecular del espermatozoide, esto principalmente debido a que el proceso de fecundación y el posterior desarrollo embrionario dependen gran parte a la integridad del ADN. El ADN espermático en el espermatozoide maduro está unido en casi un 90-95% a unas proteínas denominadas protaminas, este hecho le permite tener un estado del ADN compacto, protegiéndolo del daño principalmente durante su transporte a lo largo del tracto reproductivo femenino. Cuando el espermatozoide llega al lugar de fecundación, en teoría, debería tener el ADN íntegro, sin embargo, se sabe que los espermatozoides con el ADN dañado pueden moverse y lograr penetrar al ovocito. Por lo que esto representa un aspecto interesante, así nos preguntamos qué sucede si ingresa un espermatozoide con su ADN dañado al citoplasma de ovocito, la literatura ha proporcionado evidencia de que algún tipo de daño en el ADN espermático podría repararse en el citoplasma del ovocito. Sin embargo, no siempre

puede ser reparado con alta eficiencia, así, cuando el daño excede la capacidad de reparación por el citoplasma ovocitario, esto puede inducir alteraciones en el futuro embrión y su hipotética implantación, y consecuentemente llevar a la pareja a un estado de infertilidad (Agarwal et al., 2016; Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP, 1999; Lewis SE, John Aitken R, Conner SJ, Iulii GD, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P, 2013).

Un elevado nivel de fragmentación del ADN espermático podría afectar la fertilidad mediante diversos mecanismos: fertilización, desarrollo embrionario temprano, implantación y el embarazo (Lewis et al., 2013). Se ha determinado que el origen y el incremento de la fragmentación del ADN es multifactorial. Alteraciones en el funcionamiento celular normal contribuyen a la afectación de la fertilidad y el daño en el ADN espermático, esto puede incluir el inadecuado empaquetamiento de la cromatina y/o su remodelación durante la espermiogénesis, la producción excesiva y descontrolada de especies reactivas de oxígeno (EROS), e iniciación de eventos de apoptosis durante el proceso de maduración espermática dentro del testículo. Por otro lado, se ha observado que la exposición a toxinas, contaminantes ambientales, exceso de uso de drogas y alcohol, tratamientos de quimio y radioterapia, tabaquismo excesivo, fiebre elevada, varicocele de alto grado, edad avanzada, y otras enfermedades se han propuesto como factores que pueden aumentar el nivel de daño del ADN espermático.

## 2.2 Bases teóricas

### 2.2.1 Infertilidad masculina

La fertilidad de muchas especies de invertebrados y vertebrados requiere de una correcta y exitosa interacción entre los espermatozoides y un ovocito; en el humano, este proceso es fundamental para conformar correctamente el cigoto (primer estadio en el desarrollo embrionario). Las células germinales surgen y se propagan en un entorno que incluye factores autócrinos, parácrinos, yuxtácrinos y endócrinos dentro y fuera de las gónadas. A la fecha, a partir estudios genéticos (en ratón y humano) en conjunto con el advenimiento de nuevas tecnologías de expresión génica (*microarrays*), se ha demostrado la necesidad de una correcta y delicada coordinación de miles de productos de genes en todo el cuerpo para alcanzar el éxito reproductivo (Matzuk & Lamb, 2008).

Para la mayoría de las parejas, concebir resulta ser un evento natural de la vida, el cual no siempre implica planificación o intervención especial. Desafortunadamente, entre un 15 y un 20% de las parejas experimentan retrasos no deseados en la concepción y, en consecuencia, buscan consejo médico sobre cómo mejorar sus posibilidades de fecundación y embarazo exitoso (Trussel, 2013; 3. Agarwal A, Virk G, Ong C & du Plessis SS., 2014; Barratt C, Björndahl L, De Jonge C, Lamb D, Osorio Martini F, McLachlan R, Oates, van der Poel S, St John B, Sigman M, Sokol R, Tournaye H., 2017). Para estas parejas, la falta de éxito en la concepción no es sólo un inconveniente, sino más bien una enfermedad de su sistema reproductivo(s) (Quallich, 2006). El término infertilidad es usado para describir aquella situación donde una pareja se ve imposibilitada de alcanzar un embarazo clínico tras, al menos, 12 meses de tener relaciones sexuales sin protección regular, es decir, sin uso de métodos anticonceptivos. El tiempo límite establecido de 12 meses resulta ser arbitrario; el mismo se corresponde con el hecho de que la mayoría (aproximadamente el 85%) de las parejas que logran un embarazo

espontáneo lo harán dentro de dicho margen temporal (Guttmacher AF, 1956; Comhaire, 2010; Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte N., 2015) (Cuadro 1). El impacto en el bienestar psicológico y social que enmarcan a la infertilidad, de ambos miembros de la pareja, hace que sea una de las principales preocupaciones para los profesionales de la salud reproductiva (Kumar, 2011).

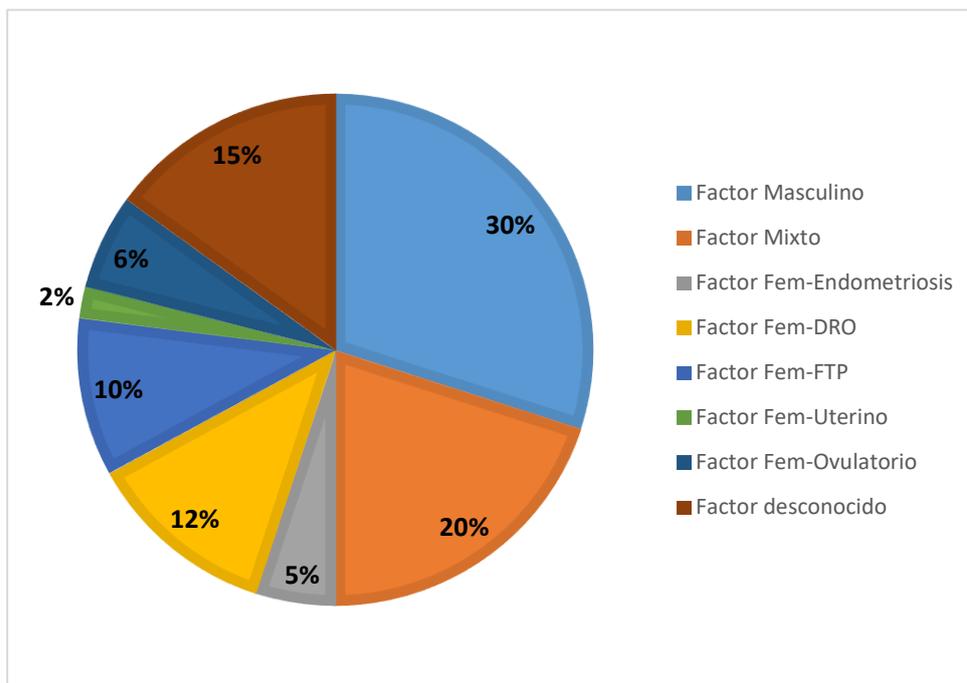
Tanto en las pautas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 2010) como en estimaciones recientes (Tournaye, Krausz & Oates, 2017), se ha indicado que, dentro de las consultas realizadas por infertilidad, el factor masculino estaría presente entre el 50-60% de los casos: un 30% debido a un factor masculino aislado, y un 20-30% asociado a factores femenino-masculino (Barrat et al., 2017; Wong, Thomas, Merkus, Zielhuis, Steegers-Theunissen, 2000; Poongothai, Gopenath & Manonayaki, 2009) (Cuadro 2). Por consiguiente, dado que la fertilidad depende tanto de factores masculinos como femeninos, la fecundidad en los hombres sólo puede ser evaluada al contextualizarse en el estado reproductivo de la pareja (Wong WY, Thomas CM, Merkus JM, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP, 2000).

**Cuadro 1. Tasa de embarazo esperada relacionada al tiempo de búsqueda.**

Tiempo de exposición	Porcentaje de embarazos
3 meses	57%
6 meses	72%
1 año	85%
2 años	93%

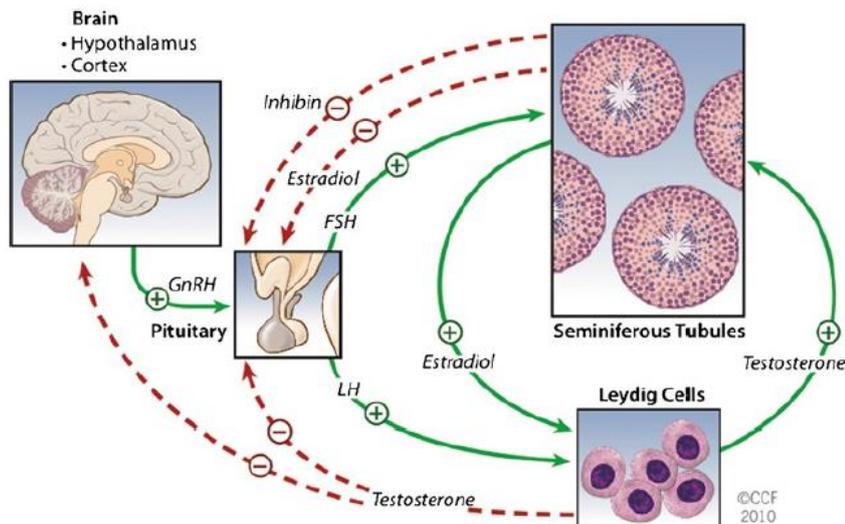
*Fuente.* Guttmacher AF (1956).

**Cuadro 2. Distribución de causas de infertilidad**

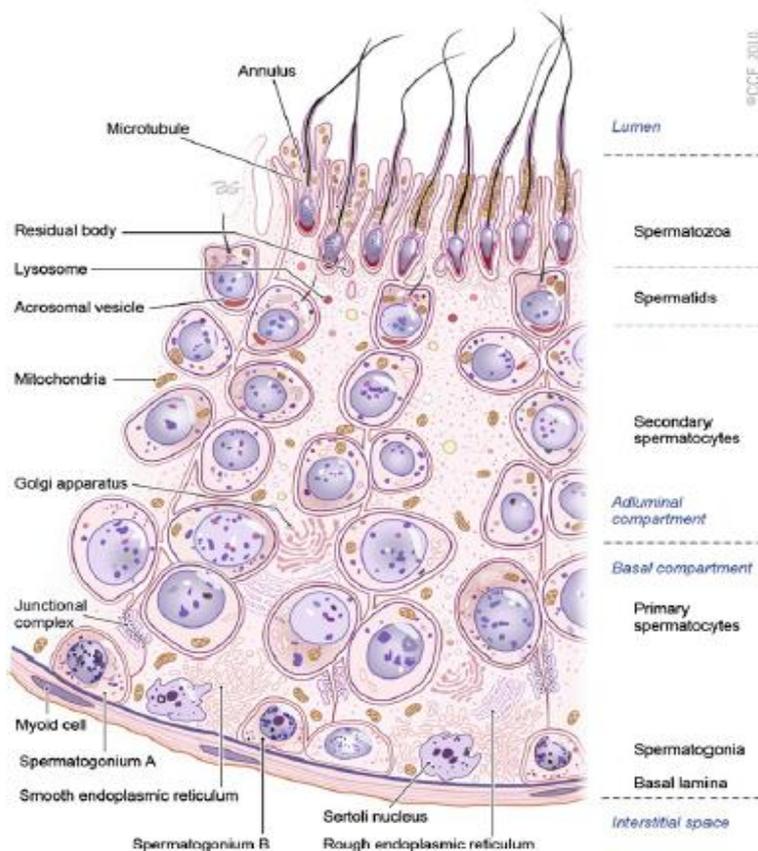


Fuente: Modificado de Barrat et al. (2017).

Para lograr un estado reproductivo óptimo, alcanzando la fertilidad, el hombre requiere de un funcionamiento correcto del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, una espermatogénesis normal, éxito en la maduración y almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo, un transporte de gametos normales y una correcta función de las glándulas accesorias, junto con el coito programado de forma adecuada (Poongothai J, Gopenath T S, Manonayaki S, 2009; Fütterer, Heijmink & Spermon, 2008) (Figura 1 y 2).



**Figura 1. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipofisi-gonada del sistema reproductor masculino.** Fuente: Cleveland Clinic for Medical Art & Photography, 2010.



**Figura 2. Representación esquemática de corte transversal del túbulo seminífero.** Fuente: Cleveland Clinic for Medical Art & Photography, 2010.

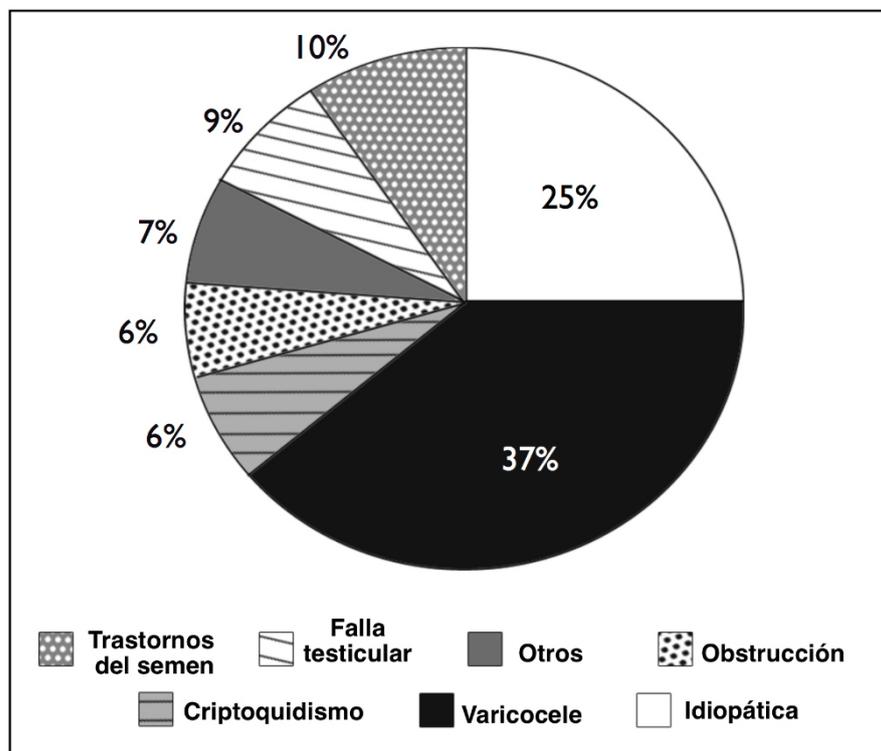
A menudo, la infertilidad masculina resulta ser un problema frustrante, ya que la misma representa un trastorno multifactorial (Tournaye et al., 2017; Poongothai et al., 2009), donde las opciones terapéuticas han sido tradicionalmente muy limitadas. Las causas de la producción y función espermática alterada podrían verse relacionadas con diferentes factores congénitos o heredados que actúan a nivel pre-testicular, testicular, o post-testicular. Dentro de las causas pre-testiculares de infertilidad, se pueden recalcar dos condiciones patológicas: el hipogonadismo hipogonadotrópico (HH) y todos aquellos trastornos coitales (disfunción eréctil, trastornos de eyaculación: eyaculación precoz, retro eyaculación, etc.). Las causas post-testiculares incluyen todo tipo de lesiones obstructivas o sub-obstructivas del tracto seminal (distal o proximal), inflamación y enfermedades infecciosas de las glándulas accesorias, así también variantes autoinmunes de infertilidad. Finalmente, son varias las patologías, catalogadas como disfunciones testiculares primarias, entre ellas se destacan varias causas bien definidas de la alteración de la producción de espermatozoides: criptorquidismo, orquitis, traumatismo testicular, torsiones, daño iatrogénico (medicación gonadotóxica, quimio/radioterapia, cirugías inguinales previas), algunas enfermedades sistémicas, varicocele, y factores genéticos (tales como anomalías en el cariotipo y microdeleciones en el cromosoma Y) (Wong et al., 2010; Zini A & Libman J, 2006; Krausz, 2011) (Cuadro 3 y 4).

**Cuadro 3. Lista de factores etiológicos involucrados en la infertilidad y sub-fertilidad por factor masculino**

<b>ANOMALIA</b>	<b>CAUSA O PATOGENESIS</b>
<b>Ausencia de tejido testicular</b>	Anorquia Castración bilateral
<b>Alteración en la producción y función espermática</b>	Síndrome de Klinefelter o variante Deleciones en el gen AZF (cromosoma Y) Hipogonadismo hipogonadotrófico Cáncer testicular Varicocele Edad Infecciones genitourinarias Factores ambientales (temperatura, radiación, medicamentos, exposición ocupacional, drogas, alcohol, tabaquismo y déficit alimenticio)
<b>Alteración en el transporte espermático</b>	Infertilidad autoinmune Bloqueo de vasos deferentes Falla eyaculatoria Impotencia Vasectomía previa
<b>Alteración en la interacción/fusión espermatozoide-ovocito</b>	Alteración de proteínas de unión primaria y secundaria entre el espermatozoide y ovocito

*Fuente.* Modificado de Wong WY et al (2000).

**Cuadro 4. Distribución de los trastornos de infertilidad masculina.**



*Fuente.* Modificado de Zini A et al. (2006)

Varios investigadores, en casos de infertilidad masculina, han evidenciado una alteración en la concentración, la motilidad y/o la morfología espermática presente en al menos una muestra de dos espermogramas, realizados con 1 a 4 semanas de diferencia, sin embargo, en un porcentaje significativo de casos la causa no logra ser identificable (Trussell, 2013), resultando en la ausencia de un diagnóstico etiológico fisiopatológico definido (Kumar, 2011; O'Brien Klof, Varghese & Agarwal, 2010).

Dentro de las opciones terapéuticas ofrecidas para tratar la infertilidad masculina, se encuentran incluidas una gran variedad de procedimientos urológicos (cirugía reconstructiva en casos de obstrucción ductal, corrección de varicocele, entre otras), intervención médico-farmacológica (uso de antioxidantes, hormonas, antibióticos, etc.), procedimientos de reproducción asistida de baja complejidad (como el caso de la

inseminación intrauterina), y aquellas más avanzadas y complejas como TRA (tratamientos de reproducción asistida) así tenemos: fertilización in vitro (FIV), y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides o ICSI, del inglés intracytoplasmic sperm injection) (Tournaye et al, 2017). El exponencial crecimiento del campo de la andrología, en paralelo con el advenimiento de los TRA, permitió que hombres cuyos parámetros seminales se encontraran severamente comprometidos logren alcanzar su objetivo último, el embarazo, y junto a él establecer una familia. A pesar de ello, los mecanismos fisiopatológicos de la infertilidad masculina son pobremente comprendidos por lo que la misma suele ser aún considerada “idiopática” en una gran cantidad de casos (Poongothai et al., 2009). Lo anterior podría, en algún punto, ser explicado por las discrepancias en las definiciones de sub-fertilidad y por los diferentes métodos utilizados en el análisis del semen (Wong et al., 2000).

Numerosos inconvenientes pueden ser encontrados a la hora de evaluar y tratar la infertilidad, principalmente por la falta de pruebas estándares para evaluarla (Kumar, 2011). La evaluación del potencial reproductivo del varón debe llevarse a cabo siguiendo normas médicas básicas, las cuales son: historia clínica o médica y examen físico general, siendo ambos obligatorios, como también un detallado análisis por imágenes y de laboratorio (Barrat et al., 2017; Krausz, 2011).

La infertilidad en los hombres puede ser diagnosticada inicialmente mediante el análisis de semen. El seminograma o espermatograma de hombres infértiles puede revelar una gran rango de condiciones anormales, que incluyen la azoospermia (ausencia de espermatozoides en la muestra, concentración=0), oligozoospermia (concentración de espermatozoides por debajo del límite de referencia: < 15 millones/mL), teratozoospermia (porcentaje de espermatozoides con morfología normal por debajo del límite de referencia: < 4%), astenozoospermia (porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo de los límites de referencia: móviles progresivos <32%), necrozoospermia (bajo porcentaje

de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado: vitalidad <58 %), y leucocitospermia (presencia de leucocitos en el eyaculado superior al valor umbral:  $\geq 1 \times 10^6$  leucocitos/mL de eyaculado) (OMS, 2010) (Cuadro 5). Se estima actualmente que alrededor del 30% de los hombres que buscan ayuda en clínicas de fertilidad, poseen una alteración seminal de etiología desconocida. Por lo tanto, existe una creciente necesidad de encontrar más causas que conllevan a la infertilidad (Agarwal et al., 2016).

**Cuadro 5. Valores de referencia para los parámetros seminales normales**

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number ( $10^6$ per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration ( $10^6$ per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR + NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)
<b>Other consensus threshold values</b>	
pH	$\geq 7.2$
Peroxidase-positive leukocytes ( $10^6$ per ml)	<1.0
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	<50
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	<50
Seminal zinc ( $\mu\text{mol}$ /ejaculate)	$\geq 2.4$
Seminal fructose ( $\mu\text{mol}$ /ejaculate)	$\geq 13$
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	$\geq 20$

*Fuente.* OMS (2010).

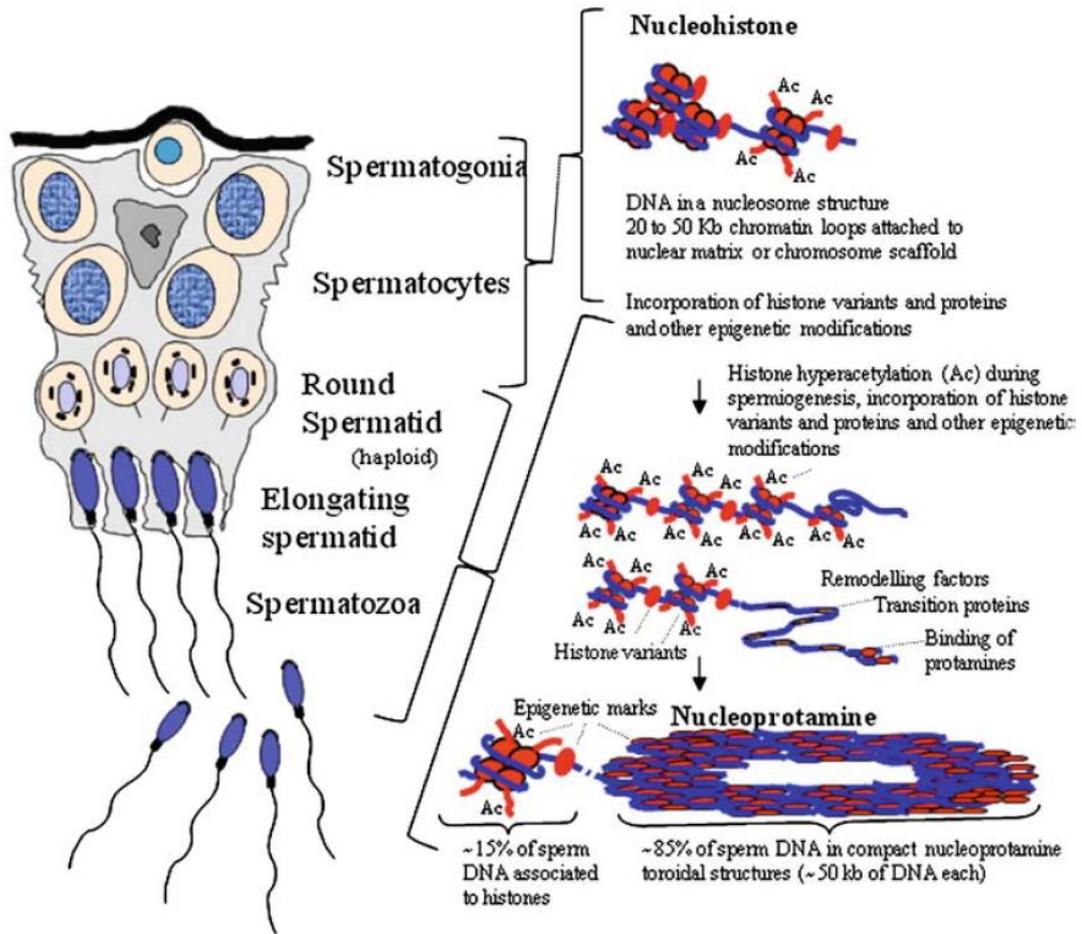
### 2.2.2 El espermatozoide humano y su ADN

En especies con reproducción sexual, las células testiculares son sometidas a una transformación sustancial a medida que progresan a través de la espermatogénesis, más específicamente durante la espermiogénesis (proceso de diferenciación morfológica y funcional ocurrida desde el estadio de espermátida redonda hasta la formación del espermatozoide maduro) (Balhorn, 2011). La espermatogénesis se caracteriza por la sustitución ordenada de histonas, proteínas altamente alcalinas de unión al ADN-propias del núcleo de células eucariotas- por otras proteínas de unión

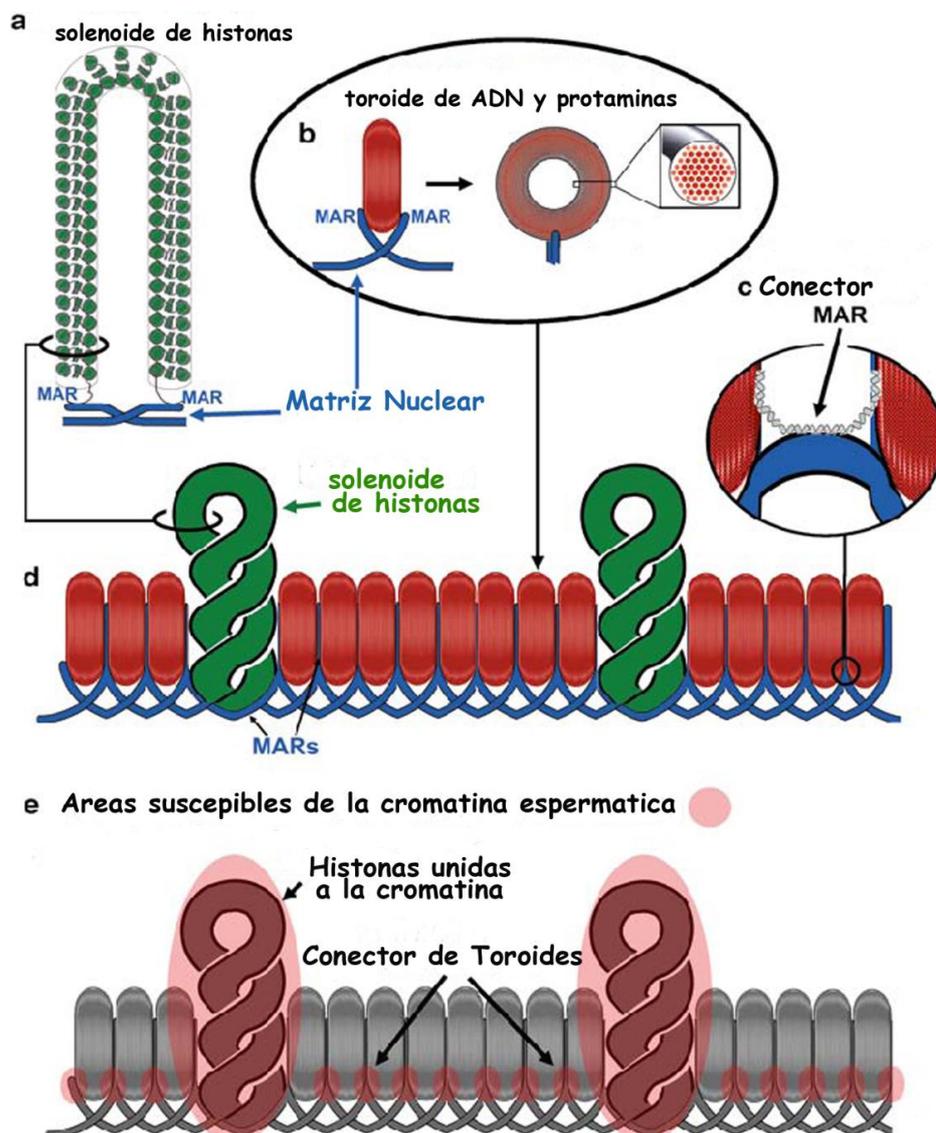
al ADN: las protaminas (en humanos  $\sim$ 85-95% de las histonas son reemplazadas por protaminas). Las histonas se encargan, entre otras cosas, del empaquetamiento y la organización del ADN en unidades estructurales llamadas nucleosomas (Balhorn, 2011). Se conocen 5 grandes familias de histonas: H1/H5, H2A, H2B, H3 y H4, específicamente las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son las encargadas de formar el nucleosoma octamérico, mientras que las histonas H1 y H5 son conocidas como las histonas nexos (Izzo, Kamieniarz & Schneider, 2008; Kowalski & Pałyga, 2012).

El propósito principal de la espermatogénesis es establecer y mantener una producción diaria de espermatozoides completamente diferenciados (Sutovsky & Manandhar, 2006). A medida que las espermatogonias emprenden esta vía de diferenciación, comienzan a incorporar variantes de histonas específicas del testículo en su cromatina (van Rooijen HJ, Ooms MP, Spaargaren MC, Baarends WM, Weber RF, Grootegoed JA, Vreeburg JT., 1998; Meistrich, Bucci, Trostle-Weige & Brock, 1985). Se ha reportado que el pico de síntesis y deposición de estas proteínas se registra durante la meiosis. En las espermátidas redondas, la mayoría de las histonas son sustituidas primero por proteínas de transición (TP) y posteriormente por protaminas (P) (Sutovsky & Manandhar, 2006; Meistrich, Mohapatra, Shirley & Zhao, 2003). Este cambio hace que la cromatina sea transformada desde una forma altamente funcional y genéticamente activa a una forma altamente electrodensa, compacta y transcripcionalmente quiescente, completamente inactiva. La remodelación de la cromatina es facilitada por la coordinada distensión de la cromatina generada por la hiperacetilación de histonas y por acción de la topoisomerasa II (topoII), quien genera “*nicks*” o roturas temporales en el ADN aliviando la presión generada por la torsión de la hebra. Ésta última, resulta ser la misma enzima que reparará dichos “*nicks*” previamente a completar la espermiogénesis y la subsecuente eyaculación (Sharma & Agarwal, 2011). Si dichos “*nicks*” no son reparados, en el eyaculado se podrán encontrar grandes cantidades de espermatozoides cuyo ADN se encuentre fragmentado (Balhorn, 2011).

En los mamíferos, la mayoría de las histonas son reemplazadas durante la espermiogénesis, luego de la meiosis (estadio de espermátida elongada) por tres proteínas- más pequeñas y más básicas- las TP: TP1 TP2 y TP4. Las mismas, complementarias entre sí, permanecen asociadas al ADN por un período relativamente corto, mientras que las histonas son removidas de la cromatina (Sharma & Agarwal, 2011). Aunque poco se sabe sobre la función de dichas proteínas, claro está que poseen un papel de real importancia en el proceso de cambio de histonas, iniciando la terminación de la transcripción de genes mediante la unión de TP2 a las islas CpG, facilitando la reparación de rupturas en las hebras de ADN, y contribuyendo con la compactación de la cromatina. Al momento que las tres TP se encuentren dispuestas sobre la hebra del ADN, la cromatina comienza a condensarse uniformemente perdiendo el aspecto de nucleosoma. Existe una cuarta proteína, la TP3, precursora de la P2; por lo tanto, TP3 sufrirá un sutil procesamiento que la convertirá en una forma más pequeña, permaneciendo unida al ADN (Balhorn, 2011; Sharma & Agarwal, 2011) (Figura 3). Defectos en el procesamiento de P2 han sido correlacionados con la infertilidad en ciertos hombres (Sharma & Agarwal, 2011). Se ha destacado la importancia de las TP tanto para la normal condensación de la cromatina, como para la reducción del número de rupturas en las hebras de ADN, así como en la prevención de defectos secundarios en los espermatozoides, defectos con eventual pérdida de la integridad genética y fertilidad (Figura 4).



**Figura 3. Organización y remodelación de la cromatina espermática durante la espermatogénesis.** Fuente: Sharma R & Agarwal A (2011).



**Figura 4.** Modelo de estructura de la cromatina espermática. Cromatina asociada a histonas, al igual que en las células somáticas, dispuestas en forma de bucles (a), cromatina unida a protaminas formando Toroides 50 Kb de longitud (b) Los toroides están unidos entre sí por una estructura denominada "conectora" la cual es muy sensible al daño (c). Los toroides de protaminas pueden ser apilados lado a lado, y así estabilizar los bucles de cromatina unida a histonas (d). Áreas sensibles al daño por parte de agentes externos: la cromatina unida a histonas y las regiones "conectoras" de toroides. Fuente: Domínguez K., Arca CDR, Ward WS (2011).

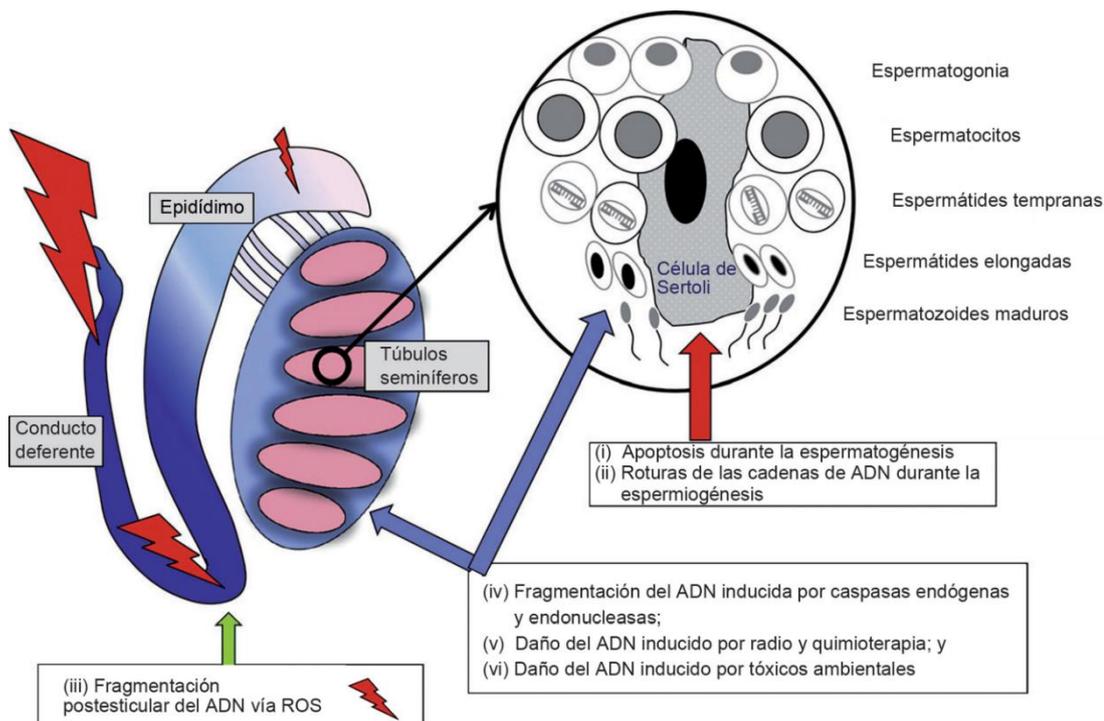
Se ha demostrado que los espermatozoides de algunos hombres infértiles poseen la proporción entre P1:P2 alterada, o los niveles de P2 no son detectables; sin embargo, se conoce que la presencia de anomalías en las protaminas de espermatozoides provenientes de hombres fértiles es extremadamente atípica (Sharma & Agarwal, 2011). La expresión anormal de protaminas se ha asociado a un bajo conteo espermático, disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles y de buena morfología, así como se ha evidenciado una reducción en la capacidad de fecundar al óvulo, y al aumento en el daño cromatínico en el espermatozoide (Rogenhofer N, Dansranjavín T, Schorsch M, Spiess A, Wang H, von Schönfeldt V, Cappallo-Obermann H, Baukloh V, Yang H, Paradowska A, Chen B, Thaler CJ, Weidner W, Schuppe HC, Steger K, 2013; Carrell, Emery & Hammoud, 2007; Castillo, Estanyol, Ballezá & Oliva, 2015; Aoki VW, Moskovtsec SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT., 2005).

El rol principal del espermatozoide es la de “entregar” al ovocito el genoma paterno en “perfectas” condiciones (Shaman & Ward, 2006). El elevado nivel de compactación y organización cromatínica aportado por las protaminas, dota al ADN del espermatozoide de una resistencia frente a una gran variedad de factores inductores de estrés. Existe evidencia que sugieren que el alto grado de condensación de la cromatina, favorecido por las portaminas, protegería al ADN espermático de la degradación por especies reactivas de oxígeno (EROS) (Domínguez, Arca & Ward, 2011). Así, el mismo se verá protegido durante su tránsito a lo largo del tracto reproductivo femenino previo a la fertilización (Sharma & Agarwal, 2011). A pesar de esta condición estructural especializada, el ADN de los espermatozoides sigue siendo susceptible a sufrir daños (Shaman & Ward, 2006).

### ***2.2.3 Daño del ADN espermático***

Se ha descrito la importancia de la estabilidad del núcleo espermático relacionado al éxito reproductivo en humanos. Así, el incremento significativo de los niveles de fragmentación del ADN estaría asociado a bajas tasas de fertilización, implantación embrionaria e incremento de abortos (Domínguez K, Arca CDR, Ward WS, 2011; Cho & Agarwal, 2017; Casanovas A, Ribas-Maynou J, Lara-Cerrillo S, Jiménez-Macedo AR, Hortal O, Benet J, Carrera J, García-Peiró A, 2019; Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, Hotaling J, Carrell DT, 2014; Simon, Zini, Dyachenko, Ciampi & Carrell, 2017; Messeguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE., 2008, Aitken, De Iulii & McLachlan, 2009; Sakkas & Alvarez, 2010).

Varias teorías han intentado explicar el origen del daño en el ADN de espermatozoides maduros; el mismo puede ser inducido tanto por factores físicos como metabólicos (Sakkas & Alvarez, 2010; Aitken JR, Smith TB, Jobling MS, Baker MA & De Iulii GN., 2014; Alvarez Sedó C, Uriondo Boudri H, Serna J, Nodar F, Papier S, Chillik C., 2012) (Figura 5). Dicho daño podría ocurrir al momento, o como resultado, del empaquetamiento del ADN durante la transición de histonas a protaminas en la espermiogénesis (Ribeiro S, Sharma R, Gupta S, Cakar Z, De Geyter C, Agarwal A., 2017). Asimismo, y de forma alternativa, la fragmentación del ADN podría resultar de la inducción de daño generada por la exposición a radicales libres o como consecuencia de la apoptosis (Balasuriya, Serhal, Doshi & Harper, 2014). Al respecto, se han detectado y descrito marcadores de apoptosis en espermatozoides humanos, como: externalización de fosfatidilserina (PS), caspasa 3 activa (CC3), p53, entre otros (Sakkas & Alvarez, 2010; Ribeiro et al., 2017).

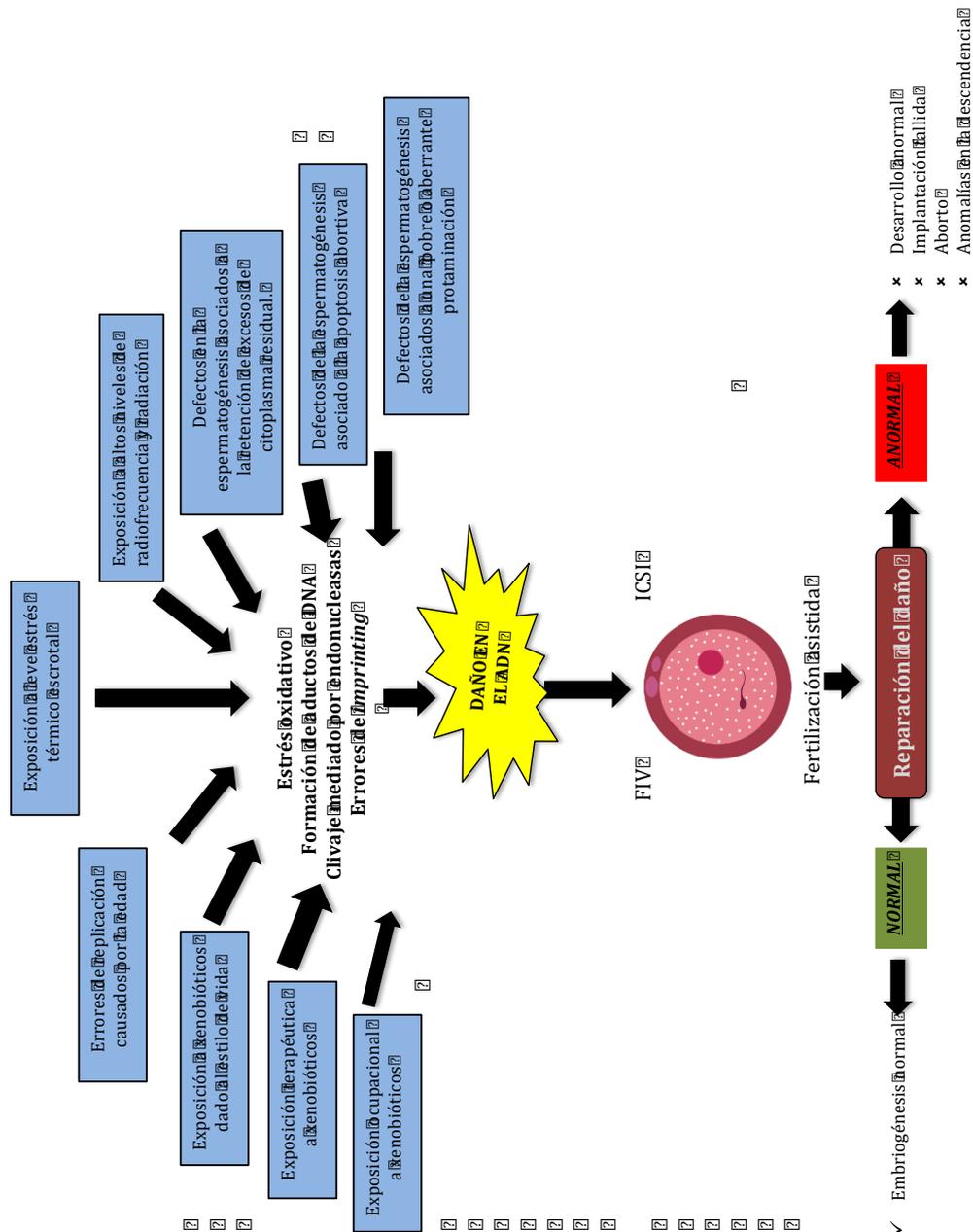


**Figura 5. Principales mecanismos que inducen al daño en el ADN del espermatozoide durante su producción o tránsito. (i) apoptosis durante el proceso de espermatogénesis; (ii) roturas de tipo doble cadena e el ADN producidos durante la reorganización de la cromatina espermática en la espermiogénesis; (iii) fragmentación del ADN a nivel pos-testicular inducida principalmente por las EROS durante el transporte de los espermatozoides en los túbulos seminíferos y el epidídimo (el incremento del daño se indica con el tamaño de los rayos rojos y el degrade en el color); (iv) fragmentación producto de caspasas y nucleasas endógenas; (v) daño de la cromatina inducida por quimio y radioterapia; (vi) daño inducido por tóxicos ambientales. Fuente: Modificada de Sakkas & Alvarez (2010).**

Cuando un espermatozoide es sometido a estrés oxidativo, tanto la membrana plasmática y la integridad del ADN, se ven comprometidas. Que un espermatozoide con el ADN dañado por acción oxidativa sea aún capaz de fecundar a un ovocito, obedecerá al grado de integridad del ADN y la funcionalidad de los componentes espermáticos luego de sufrir estrés oxidativo (Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Aitken RJ., 2017). El daño oxidativo en espermatozoides de mamíferos (ruptura de las hebras de ADN, peroxidación lipídica de la

membrana plasmática, entre otros) inducido por radicales libres ha sido asociado con la disminución de antioxidantes, presencia de metales de transición en el medio de cultivo, contaminación de leucocitos, calentamiento testicular, entre otros (Trussell, 2013; Dorostghoal et al., 2017; De Iuliis, 2007).

El daño a la integridad del material genético de espermatozoides de eyaculado ha sido correlacionado con el estrés oxidativo (generado de forma endógena o como estímulo exógeno), y con el deterioro de la función y competencia espermática. La capacidad del estrés oxidativo de impedir la correcta funcionalidad de espermatozoides humanos fue descrita por primera vez en 1943 por MacLeod, al registrar el impacto negativo generado por las altas tensiones de oxígeno en la motilidad espermática (Du Plessis, Agarwal, Halabi & Tvrdá, 2015). A la fecha, la literatura expresa que tanto la motilidad de los espermatozoides, la competencia para lograr una adecuada reacción acrosomal, la capacidad de fusionarse con la membrana del ovocito, y la integridad de su material hereditario son susceptibles al sufrir daño oxidativo. Sin embargo, aún no está del todo detallada la progresión en que estas estructuras y funciones se deterioran después de una injuria oxidativa; por lo tanto, la posibilidad de que dichos espermatozoides con el ADN dañado puedan fecundar al ovocito y generar un embrión viable resulta aún una incógnita (Aitken JR, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iulliis GN, 2014; Aitken, 2017) (Figura 6).



**Figura 6: Los factores implicados en la etiología de daño del ADN en la línea germinal masculina.** Fuente: Modificado de Aitken & De Iuliis (2007).

### *2.2.3.1 Mecanismos que inducen daño en el ADN espermático*

#### **- Inducción de apoptosis durante el proceso de espermatogénesis:**

Durante el proceso de espermatogénesis las células de Sertoli son las responsables de promover la apoptosis hasta en el 60 % de las células germinales que entran en meiosis I. Estas células son predestinadas mediante marcadores de apoptosis del tipo fas para que posteriormente sean fagocitadas y eliminadas por las células de Sertoli (Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizarro D, Bianchi PG, Bianchi U., 1998). Sin embargo, este mecanismo no siempre funciona de manera eficiente, y algunas de las células germinales alteradas pueden aparecer en el eyaculado. En relación a esto, los resultados de Burrello (Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di BD, De PA., 2004), sugieren que no hay relación entre la calidad genómica de la célula germinal y la remodelación espermática que tiene lugar durante la espermiogénesis. Esto significa que, una célula germinal puede tener un núcleo perturbado por apoptosis, ser aneuploide, y mantenerse, resultando así en un espermatozoide móvil con morfología normal. Por lo tanto, el hecho de que un espermatozoide tenga morfología normal no significa que su calidad e integridad del ADN sea adecuada. Se ha propuesto que los fenómenos de apoptosis durante la espermiogénesis quizás estén poco relacionados con la muerte celular, como suele ocurrir en cualquier célula somática, sino que ésta puede estar implicada en el mecanismo de la remoción del citoplasma excedente hacia el final de la espermiogénesis (Sakkas et al., 2009).

Se ha evidenciado que varones con oligozoospermia, la probabilidad de que tengan espermatozoides aneuploides es mucho más elevada que hombres normozoospermicos. (Burrello et al., 2004). Esto probablemente puede estar vinculado con la detención parcial durante la maduración espermática asociada con alteraciones meióticas. El hecho de que un porcentaje variable de espermatozoides exprese marcadores apoptóticos como fosfatidilserina, p53, Fas, Bcl-Xl (Sakkas, Cayli, Vigue, Demir & Huszar, 2004), indica que

este fenómeno puede ser usado para seleccionar los espermatozoides no apoptóticos en una muestra de semen (Said et al., 2005).

**- Roturas en el ADN durante el proceso de espermiogénesis:**

Alteraciones durante el remodelamiento de la cromatina en la espermiogénesis puede resultar en la fragmentación del ADN. McPherson y Longo (1993) postularon que la presencia de roturas o “cortes” en la cadena de ADN en espermatozoides eyaculados pueden ser indicativo de una maduración incompleta durante la espermiogénesis. Ellos postularon que durante el empaquetamiento de la cromatina se necesita actividad de nucleasas endógenas para crear y ligar estos cortes (“*nicks*”), y así, facilitar el proceso de protaminación. Se piensa que los cortes alivian el estrés producto de la torsión de las hebras de cromatina para ayudar a su disposición durante el reemplazo de histonas por protaminas. Alteraciones en el control de este proceso podrían resultar en la presencia de anomalías durante el empaquetamiento de la cromatina, o bien en roturas de ADN que no son reparadas.

**- Fragmentación del ADN post-testicular vía EROS:**

Se ha demostrado que los espermatozoides inmaduros, quienes producen altos niveles de EROS, pueden inducir al daño en el ADN en espermatozoides maduros. Este daño podría producirse luego de la espermiación (liberación de los espermatozoides hacia la luz del túbulo seminífero), más precisamente durante la movilización de espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos hacia la cauda del epidídimo (Agarwal A, Ollero M, Gil-Guzmán E, López MC, Sharma RK, Larson K, 2001).

Es muy probable, que el espermatozoide que tiene una alta proporción de su ADN dañado tendría a su vez bajos niveles de enlaces di-sulfuro en su cromatina, característica que se adquiere durante el proceso de maduración espermática en el tránsito por el epidídimo. Algo que es muy interesante y

que actualmente se encuentra en revisión y discusión, es que el grado de fragmentación de ADN en espermatozoides eyaculados suele ser más alto que en espermatozoides testiculares (Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, 2005, Esteves, Santi & Simoni, 2019), así como en los espermatozoides del cuerpo y cola del epidídimo. En la actualidad, este punto ha llevado a muchos andrólogos a pensar que el uso de espermatozoides testiculares podría favorecer la disminución en el porcentaje de espermatozoides dañados y ser usados en los tratamientos de fecundación in vitro.

Respecto al epidídimo y la fragmentación del ADN espermático, se ha propuesto que podría haber un mecanismo extra de control al convencionalmente realizado por las células de Sertoli, por lo que existiría otro mecanismo de regulación orientado a eliminar aquellos espermatozoides genómicamente defectuosos (Suganuma, Yanagimachi & Meistrich, 2005; García-Rodríguez, Gosálvez, Agarwal, Roy & Johnston, 2018).

Por otra parte, el daño en el ADN espermático que tiene lugar a nivel post-testicular y que es inducido por radicales libres está asociado con la presencia de la base modificada 8-hidroxi-2'-Deoxiguanosina (8-OHdG). En este tipo de mecanismo que afecta la integridad del ADN, el primer estadio de daño generado es la 8-OHdG, seguido por la fragmentación, de tipo doble cadena, que en el ADN que puede ser ejecutado por caspasas o endonucleasas (Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T., 1997).

**- Activación de caspasas y endonucleasas:** La activación de caspasas en el espermatozoide por parte de radicales libres o factores fisicoquímicos podrían estar involucradas en la inducción de la fragmentación del ADN. Estudios previos demostraron que la exposición de espermatozoides de

ratón a altas temperaturas (> 40°C) incrementa significativamente la fragmentación en el ADN (Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP., 1997). Así también, se demostró la inducción de fragmentación en el ADN de espermatozoides de ratón in vivo exponiéndolos a temperaturas externas de 42°C (Banks, King, Irvine & Saunders, 2005), logrando finalmente afectar la capacidad reproductiva de estos animales (Paul, Murray, Spears & Saunders, 2008). Debido a que el incremento de la fragmentación en el ADN de estos ratones ocurrió dentro de la hora post-exposición al calor, los investigadores concluyeron que el daño observado probablemente tuvo lugar en el epidídimo y habría sido causado principalmente por EROS, o por activación de caspasas y endonucleasas. Considerando que, el núcleo del espermatozoide del ratón está más homogéneamente compactado que el núcleo del espermatozoide humano, este último podría más susceptible al calor. Esto se debe a que en los espermatozoides humanos hay menores niveles de protaminas y más heterogeneidad en la compactación del núcleo (Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D., 1993).

**- Fragmentación del ADN inducida por quimioterapia y radioterapia:**

Se ha reportado que la exposición a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia (en pacientes con Cáncer) puede también resultar en la inducción de fragmentación en el ADN del espermatozoide. Se cree generalmente que los tratamientos contra el cáncer afectan adversamente a la fertilidad masculina y que la reducción en el número de espermatozoides surge de efectos citotóxicos que producen la quimioterapia y radioterapia en el epitelio germinal (Morris, 2002; Kumar K, Lewis S, Vinci S, Riera-Escamilla A, Fino MG, Tamburrino L, Muratori M, Larsen P, Krausz C., 2018). Sin embargo, estudios específicos en el ADN de espermatozoides han sido limitados solo a pacientes con cáncer; una investigación encontró que la compactación e integridad del ADN espermático estaban afectados en pacientes con cáncer testicular y linfoma de Hodgkin antes de la quimioterapia (O'Flaherty, Vaisheva, Hales, Chan & Robaire, 2008). Cuando se examinó la integridad del ADN por medio de diferentes ensayos

(Cometa, Ensayo de la estructura de la cromatina espermática y TUNEL), todos detectaron daño a nivel del ADN en los espermatozoides de dichos pacientes.

#### *2.2.3.2 Compactación de la cromatina y susceptibilidad al daño del ADN*

Desde el punto de vista evolutivo la compactación del ADN espermático mediante las protaminas, tiene al menos cuatro objetivos: (1) proteger al ADN durante el tránsito en los tractos reproductivos masculino y femenino previo a la fertilización, (2) hacer al ADN más compacto para optimizar la movilidad del espermatozoide, (3) silenciar factores de transcripción en el espermatozoide maduro, (4) minimizar la fertilización cruzada con otras especies.

Existen evidencias que sugieren que la condensación por protaminas es crítica para la degradación del ADN por parte de las especies reactivas del oxígeno (EROS). Aitken y De Iullis (2007) argumentaron que el espermatozoide es muy susceptible al estrés oxidativo (Aitken et al., 2009; Alvarez, Touchstone, Blasco & Storey, 1987; Alvarez & Storey, 1995), y además del ataque al ADN por parte de los EROS, coincidía con la formación de la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8OHdG), argumentando de este modo que las protaminas juegan un rol clave al efectuar en el ADN acción de protección ante el daño inducido por estrés oxidativo.

Por lo tanto, la adecuada compactación y estabilización del ADN nuclear espermático es clave para la protección de este material ante el estrés oxidativo. Entre las diferentes especies de mamíferos, los espermatozoides humanos parecen ser los más susceptibles al daño en su ADN que el resto de las especies y esto se debe principalmente a la protamina 2, presente solo en los espermatozoides humanos, la cual posee un número limitado de grupos tioles para los enlaces disulfuro (Jager, 1990). Es por eso que cuando existen fallas tanto en la capacidad del testículo para lograr un

adecuado mecanismo de protaminación, o bien en la capacidad del epidídimo para mantener los enlaces di-sulfuro establecidos por protaminas, también se hacen evidentes imperfecciones en la estabilidad de la cromatina. Tales deficiencias en el empaquetamiento y estabilidad de la cromatina están asociadas con el incremento del daño en el ADN (Sakkas et al., 1998)

#### *2.2.3.3 El estrés oxidativo como inductor del daño en el ADN espermático*

El término estrés oxidativo es aplicado cuando los agentes oxidantes superan en número a los antioxidantes (Sies, 1993), desarrollándose así productos de peroxidación (Spitteler, 1993) y como consecuencia de este fenómeno se desarrollan efectos patológicos en células y tejidos (Janssen, Van-Houton, Borm & Mossuran, 1993). El estrés oxidativo está implicado en numerosas enfermedades tales como cáncer, enfermedades de tejido conectivo, envejecimiento, infecciones, inflamaciones, SIDA e infertilidad masculina (Aitken et al., 1992; Aitken et al., 1995). En el semen, el estrés oxidativo es el resultado de un desbalance entre las especies reactivas del oxígeno (EROs) generadas y las actividades de control por parte de las enzimas antioxidantes. Particularmente, los espermatozoides son susceptibles al daño oxidativo debido a que en su membrana plasmática están presentes grandes cantidades de ácidos grasos polinsaturados (Alvarez & Storey, 1995) y, además, su citoplasma contiene bajas concentraciones de enzimas antioxidantes (Jones, Mann & Sherins, 1979; Aitken & Fisher, 1994; de Lamirande & Gagnon, 1995; Sharma & Agarwal, 1996).

Las EROs son una gama de metabolitos derivados de la reacción de reducción del oxígeno y son agentes altamente reactivos que pertenecen a una clase de moléculas reactivas y radicales libres (Aitken & Fisher, 1994). Un radical libre es definido como “cualquier especie química que posee uno o más electrones desapareados” (Warren, Johnson & Ward, 1987). Tales electrones son altamente energéticos y buscan aparearse con

cualquier otro electrón, y es esta característica es lo que le confiere a los radicales libres su alta reactividad. Por lo tanto, tienen la habilidad de reaccionar y modificar la estructura de un amplio rango de biomoléculas tales como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Algunos de los radicales libres son: el anión superóxido y el radical hidroxilo, especies moleculares derivadas de la reacción de átomos de carbono con el oxígeno molecular como los radicales peroxilo, radicales alcoxilos e hidroperóxilos orgánicos, peroxinitrito, ácido hipocloroso y el radical libre más activo biológicamente, el óxido nítrico. Este último también está involucrado en la regulación de la función espermática (Herrero & Gagnon, 2001).

Sin embargo, las EROs también son mediadores importantes en la función espermática normal y están involucradas en la inducción y el desarrollo de la hiperactivación en el espermatozoide, capacitación y reacción acrosómica (Jones et al., 1979; de Lamirande & Gagnon, 1995; Griveau, Dumont, Renard, Callegari & Le Lannou, 1995). No obstante, un exceso en los niveles de EROS resulta en la peroxidación lipídica y daño en la membrana. Esto puede repercutir de diferentes modos como: pérdida de movilidad, daño en las membranas acrosomales (Alvarez y Storey, 1995), y oxidación en el ADN (Fraga, Motchnik & Shigenaga, 1991) haciendo a una célula espermática incapaz de fertilizar al ovocito, o bien, producir un embarazo no viable. Se ha reportado que altos niveles de EROS están presentes en el 25% al 40% de muestras de semen de pacientes infértiles (de Lamirande y Gagnon 1995).

La significancia clínica del estrés oxidativo en la etiología de los defectos en la función espermática fue estudiada en primer lugar por Thaddeus Mann y sus colegas en la Universidad de Cambridge (Jones et al., 1979). Estos investigadores observaron que existía una correlación positiva entre la proporción de contenidos de lípidos peroxidados en espermatozoides humanos y la pérdida severa de la movilidad. La relación entre la pérdida

de movilidad y estrés oxidativo ha sido demostrada por varios estudios independientes (Aitken & Fisher, 1994; Sharma & Agarwal, 1996).

Los mecanismos mediante el cual la peroxidación lipídica conduce a la pérdida de movilidad espermática, probablemente incluyen cambios en la fluidez e integridad de la membrana plasmática que a su vez producen fallas en el mantenimiento de las funciones de la membrana que son críticas para el movimiento flagelar. Además, este mecanismo altera otras funciones espermáticas dependientes de la actividad de su membrana, tales como la fusión ovocito-espermatozoide y la capacidad de someterse a la reacción acrosómica (Jones et al., 1979).

La peroxidación lipídica es generalmente definida como “el deterioro oxidativo de los ácidos grasos polinsaturados”, ácidos grasos que contienen más de dos doble enlaces carbono-carbono (Halliwell, 1984). La cascada de peroxidación lipídica ocurre en dos etapas fundamentales: iniciación y propagación. El radical hidroxilo es un potente iniciador de la peroxidación lipídica. La mayoría de los ácidos grasos polinsaturados tienen dobles enlaces aislados (no conjugados) que están separados por grupos metilos. La presencia de un doble enlace adyacente al grupo metilo hacen más débiles los enlaces C-H metilo, por lo tanto, el átomo es más susceptible para su sustracción. Una vez que ocurre esta sustracción, el radical producido es estabilizado por el resguardo de los dobles enlaces, los cuales forman un radical dieno conjugado que puede también ser oxidado. Esto significa que los lípidos, quienes poseen muchos doble enlaces metilos interrumpidos son, particularmente susceptibles a la peroxidación. Los hidroperóxidos lipídicos son estables bajo condiciones fisiológicas, hasta que ellos contactan con metales de transición tales como el hierro o sales de cobre. Estos metales o sus complejos producen hidroperóxidos lipídicos para generar radicales alcoxilos y peroxilos, los cuales luego continúan la reacción en cadena dentro de la membrana y propagando el daño a través de la célula (Halliwell, 1984). La propagación de la peroxidación

dependerá de las estrategias antioxidantes empleadas por el espermatozoide.

La capacidad de los antioxidantes como el alfa-tocoferol (Vitamina E) de rescatar la movilidad del espermatozoide *in vivo* e *in vitro*, es una gran evidencia de que la peroxidación lipídica es una de las mayores causas de pérdida de movilidad en poblaciones espermáticas (Suleiman SA, Elamin Ali M, Zaki ZMS, El-Malik EMA and Nasr MA., 1996). El daño oxidativo que puede afectar a los espermatozoides humanos puede ser originado desde muchas fuentes posibles. En primer lugar, los leucocitos. Estos tipos celulares suelen contaminar muchas muestras de semen humano y están ampliamente constituidos por neutrófilos que comúnmente están en estado activo. La presencia de radicales libres generados por los leucocitos tienen la capacidad de generar cierto grado de estrés oxidativo. Esto depende de varios factores como: tipo de leucocitos que está presente, de su estadio de activación, y de su origen (Aitken & Baker, 1995). Si los leucocitos tienen origen en los órganos sexuales secundarios, tales como la próstata o las vesículas seminales, tendrán la capacidad de provocarle daño oxidativo al espermatozoide. Sin embargo, tal daño, será posteriormente contrarrestado por la poderosa acción de los antioxidantes presentes en el plasma seminal humano quienes son los responsables de eliminar los radicales libres. Algunos de estos antioxidantes son, el ácido ascórbico o el ácido úrico, y enzimas antioxidantes como la Superóxido dismutasa (SOD) y la Glutación peroxidasa (Aitken & Baker, 1995). Como consecuencia de esta acción protectora, en una muestra normal de semen humano los neutrófilos tienen una concentración por debajo 1.000.0000/mL (OMS, 2010). Sin embargo, si, por ejemplo, el plasma seminal es removido y los espermatozoides entran en contacto con los leucocitos por centrifugación, al haber ausencia de los mecanismos antioxidantes, hay presencia de daño oxidativo hacia el espermatozoide. Resultando, entonces, perjudicada la integridad genómica y estructural del espermatozoide (Twigg, Irvine & Aitken, 1998). Otra fuente potencial de EROs son los mismos espermatozoides. El estrés oxidativo se puede originar en las células de la línea germinal también

como consecuencia de una deficiencia en la protección antioxidante otorgado por el tracto reproductivo masculino (Sharma & Agarwal, 1996).

Hay dos factores que protegen al espermatozoide de la agresión oxidativa: el empaquetamiento preciso de su ADN y, como se dijo anteriormente, los antioxidantes presentes en el plasma seminal (Twigg et al., 1998). Se han realizado estudios en los cuales espermatozoides que fueron expuestos artificialmente a estrés oxidativo, mostraron un incremento significativo en el daño al ADN evidenciado de diversas formas, tales como: la modificación de todas las bases, producción de sitios libres en las bases, deleciones, entrecruzamientos de ADN y re-arreglos cromosómicos (Duru, Morshedi & Oehninger, 2000). El estrés oxidativo ha sido también correlacionado con altas frecuencias de daño en el ADN tanto de simple como doble cadena. (Twigg et al., 1998).

Evidencias contundentes sugieren que elevados niveles de EROs median la fragmentación en el ADN comúnmente observada en espermatozoides de pacientes infértiles (Kodama et al., 1997; Martins, Majzoub & Agarwal, 2019).

#### *2.2.3.4 Métodos de detección del daño en el ADN espermático*

Desde hace más de dos décadas se han planteado diferentes pruebas para cuantificar directa o indirectamente la fragmentación del ADN espermático, con el objetivo de valorar el efecto que ocasiona en los resultados reproductivos en parejas infértiles. Las pruebas para medir fragmentación del ADN espermático más utilizadas son:

- **TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUDP nick-end labelling assay).**

En 1992, se describió una técnica que permitió evidenciar y cuantificar la tasa de muerte celular programada (in situ). Los autores asociaron la muerte programada con la presencia de fragmentación del ADN, necesaria para el desarrollo biológico y el mantenimiento de tejidos en renovación (Gavrieli, Sherman & Ben-Sasson, 1992).

Esta metodología se basa en la unión definida de la enzima transferasa terminal deoxinucleotidilo (TdT) a las terminaciones 3'OH del ADN ("nicks"), este fenómeno permite la creación de una molécula de polideoxinucleotido. En esta prueba, el TdT, se utiliza para incorporar deoxiuridina biotilada en los sitios de roturas ("nicks") del ADN con el objetivo de posteriormente aumentar la señal para ser observada por microscopio de luz o de fluorescencia.

Anteriores reportes han manifestado que la utilización de esta metodología ha expuesto un alto valor predictivo para valorar la fertilidad masculina en relación a la concepción natural, evidenciándose un 96,5% de sensibilidad y 89,4% de especificidad para determinados valores de corte (Sergerie, Laforest, Bujan, Bissonnette & Bleau, 2005; Sergerie, Laforest, Boulanger, Bissonnette & Bleau, 2005).

- **COMET (prueba de electroforesis).**

En el año 1984 se describió un método para cuantificar el daño del ADN basado en la técnica de micro-electroforesis (Ostling & Johanson, 1984). Posteriormente se realizaron modificaciones para ser usada en espermatozoides. Para esto, los espermatozoides se deben colocar sobre una matriz de agarosa, de bajo punto de fusión, y posteriormente lisada mediante una solución de sales, gracias a este procedimiento se puede lograr eliminar las protaminas e histonas remanentes del ADN.

Posteriormente, cuando se someten a los espermatozoides a condiciones alcalinas, esto provoca un desenrollamiento de la doble hebra del ADN y así se puede producir la migración de las cadenas rotas al ánodo, evidenciándose una especie de cola o estela de un cometa cuando es observado bajo el microscopio (Hughes, Lewis, McKelvey-Martin & Thompson, 1996). El largo y la intensidad de la cola estará relacionada al nivel del daño que tenga el espermatozoide (Simon & Carrel, 2013).

Entre sus ventajas esta de que se necesitan alrededor de 5000 espermatozoides de un paciente/muestra, por lo que es factible de realizar en muestras con poco recuento espermático. Esta metodología permite medir tantas roturas de simple y doble hebra del ADN (Lewis et al., 2013).

#### - **SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay).**

Esta metodología fue la primera en implementarse para cuantificar y establecer parámetros de calidad seminal en pacientes infértiles (Evenson et al, 1991). A diferencia de las anteriores, esta prueba mide indirectamente la “susceptibilidad” del ADN espermático a la desnaturalización por ácido, es decir, no mide directamente el daño in situ establecido en el ADN espermático. En sus inicios, para esta metodología, se debía tratar la muestra de semen a pH muy bajos con el objetivo de dividir las hebras de ADN en los sitios de rotura, luego, se utilizaba el colorante naranja de acridina, el cual ayudaba a identificar las cadenas rotas de las intactas mediante un viraje de color del verde al rojo (Darzynkiewicz, Traganos, Sharpless & Melamed, 1975).

Con esta técnica se empieza a incorporar el índice de fragmentación en pacientes infértiles (Evenson y cols., 1999). Desde el punto de vista histórico, es importante valorar que esta técnica, el SCSA, ha sido la más difundida y estudiada desde la clínica, sin embargo, en los últimos tiempos

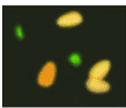
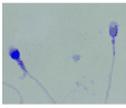
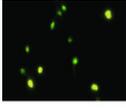
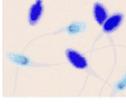
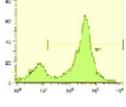
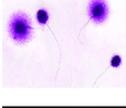
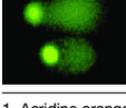
se ha visto un incremento en el uso de la técnica de TUNEL y SCD en ensayos clínicos.

**- SCD (Sperm Chromatin Dispersion Test).**

En esta metodología, cuando el ADN espermático es tratado mediante desnaturalización ácida y se procede a una posterior tinción (fluorescente o no), se puede observar la formación de “halos”, este evento es característico de las hebras de ADN cuando están intactas. Por el contrario, cuando el ADN espermático se encuentra dañado no se forman halos. A inicios de la década del 2000, se introdujo la prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD) (Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG., 2003). En este estudio, se incluyeron 30 pacientes, 20 de infértiles y 10 donantes de semen (control). Es interesante resaltar, que esta prueba (SCD) está delimitada a medir la no presencia de daño, no así, la cuantificación del mismo. Sin embargo, a diferencia de las otras metodologías, se considera como sencilla, rápida y reproducible. Por otro lado, a lo largo de los años se ha podido encontrar de forma comercial y no requiere de equipamiento sofisticado (Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C., 2005).

En el cuadro 6 se representa los principios metodológicos, ventajas y desventajas de las principales técnicas reportadas para valorar la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos (Cho CL, Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, 2017)

***Cuadro 6. Principios / Ventajas y desventajas de los diferentes métodos para medir la fragmentación del ADN espermático.***

	Test	Principle	Advantage	Disadvantage
	AO test	Metachromatic shift in fluorescence of Acridine orange when bound to ss DNA. Uses fluorescent microscopy	Rapid, simple and inexpensive.	Inter-laboratory variations and lack of reproducibility
	AB staining	Increased affinity of AB dye to loose chromatin of sperm nucleus. Uses optical microscopy	Rapid, simple and inexpensive	Inter-laboratory variations and lack of reproducibility
	CMA3 staining	CMA3 competitively binds to DNA indirectly visualizing protamine deficient DNA. Uses fluorescent microscopy	Yields reliable results as it is strongly correlated with other assays	Inter-observer variability
	TB staining	Increased affinity of TB to sperm DNA phosphate residues. Uses optical microscopy	Rapid, simple and inexpensive	Inter-observer variability
	TUNEL	Quantifies the enzymatic incorporation of dUTP into DNA breaks. Can be done using both optical microscopy or fluorescent microscopy. Uses optical microscopy, fluorescent microscopy and flow cytometry	Sensitive, reliable with minimal interobserver variability. Can be performed on few sperm	Requires standardization between laboratories
	SCSA	Measures the susceptibility of sperm DNA to denaturation. The cytometric version of AO test. Uses flow cytometry	Reliable estimate of the percentage of DNA-damaged sperm	Requires the presence of expensive instrumentation (flow cytometer) and highly skilled technicians
	SCD or Halo test	Assess dispersion of DNA fragments after denaturation. Uses optical or fluorescent microscopy	Simple test	Inter-observer variability
	SCGE or comet assay	Electrophoretic assessment of DNA fragments of lysed DNA. Uses fluorescent microscopy	Can be done in very low sperm count. It is sensitive and reproducible	Requires an experienced observer. Inter-observer variability

1, Acridine orange (AO) stains normal DNA fluoresces green; whereas denatured DNA fluoresces orange-red; 2, aniline blue (AB) staining showing sperm with fragmented DNA and normal sperm; 3, chromomycin A3 (CMA3) staining: protamine deficient spermatozoa appear bright yellow, spermatozoa with normal protamine appear yellowish green; 4, toluidine blue (TB) staining: normal sperm appear light blue and sperm with DNA fragmentation appear violet; 5, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-deoxyuridine triphosphate-nick end labeling (TUNEL) assay fluorescent activated cell sorting histogram showing percentage of sperm DNA fragmentation; 6, sperm chromatin structure assay (SCSA): flow cytometric version of AO staining; 7, sperm chromatin dispersion (SCD) test: spermatozoa with different patterns of DNA dispersion; large-sized halo; medium-sized halo [2]; very small-sized halo; 8, comet images showing various levels of DNA damage.

*Fuente:* Cho CL., et al. (2017).

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Tipo y diseño de investigación**

El presente proyecto de investigación de tipo cuantitativo plantea un diseño observacional-analítico, prospectivo, correlación y de comparación.

#### **3.2 Población de estudio**

Se incluyó una población de varones infértiles y fértiles que asistieron a un centro de fertilidad y que aceptaron que sus muestras de semen, embriones producidos luego de un tratamiento de fecundación in vitro que han detenido su desarrollo, y sus datos clínicos que sean incluidos en el presente proyecto mediante la firma de un consentimiento informado (Anexo N°1: consentimiento adjunto).

#### **3.3 Tamaño de la muestra**

Se tomó en cuenta población total de 1560 varones infértiles y 200 varones fértiles.

### **3.4 Selección de la muestra**

#### ***3.4.1 Criterios de inclusión***

Se consideraron muestras de semen de pacientes que realizaron una consulta por infertilidad o aquellos que hacen tratamiento de reproducción humana asistida (FIV o ICSI). Se consideraron varones fértiles aquellos que tuvieron un hijo nacido en un periodo no mayor a 6 meses.

Las muestras para ser incluidas debieron presentar un volumen mayor a 0,5 mL, una concentración mayor a 1 millón de espermatozoides/mL de semen.

Los pacientes fueron categorizados como normogonadotróficos (niveles normales: TSH (Hormona estimulante de tiroides – tirotropina): 0.4-4 uUI/mL, FSH (Hormona folículo estimulante) 1-8UI/L, LH (Hormona luteinizante) 1-8 UI/L y Prl (Prolactina): 2-18 ng/mL.

#### ***3.4.2 Criterios de exclusión***

Se excluyeron pacientes que presentaron hipospermia (bajo volumen seminal), oligozoospermia severa (concentración menor a 1 millón de espermatozoides /mL) o azoospermia (obstructiva o secretora) según los criterios de la OMS, 2010.

Pacientes con: serología positiva para HIV, Hepatitis B-C.

Pacientes con: Varicocele con/sin cirugía.

### **3.5 Procesamiento de las muestras de semen**

Las muestras de semen que se utilizaron para el estudio fueron obtenidas luego de un periodo de abstinencia de entre 3-5 días. Dichas muestras de semen fueron obtenidas por masturbación y recolectadas en un frasco estéril. Luego de la licuefacción de 60 minutos a temperatura ambiente, se tomó un alícuota para realizar el análisis de los parámetros seminales, tales como volumen, concentración, movilidad, pH y viscosidad, según los criterios de la organización Mundial de la Salud (OMS). Posteriormente de cada muestra se extrajo una porción para dar lugar al procedimiento de gradiente (recuperación de espermatozoides móviles), por lo tanto, de cada muestra de paciente se dividió en dos porciones:

- Fracción de muestra entera: sin tratamiento (ME): corresponde a la muestra completa (espermatozoides con movilidad: progresiva, no progresiva e in situ, y los inmóviles).
- Fracción de post gradiente (MG): corresponde a una población de espermatozoides en su mayoría móviles.

### **3.6 Estudio de la calidad seminal y daño del ADN espermático**

#### ***3.6.1 Movilidad espermática***

Se registró los parámetros seminales generales según la OMS 2010, sin embargo, en relación a la movilidad se registró una modificación de estos parámetros, así, se consideró la movilidad progresiva rápida (a), progresiva lenta (b), movimiento in situ no progresivo (c), y los que no tenían movimiento (d). La movilidad progresiva es la suma de a+b. La movilidad se expresó en porcentaje.

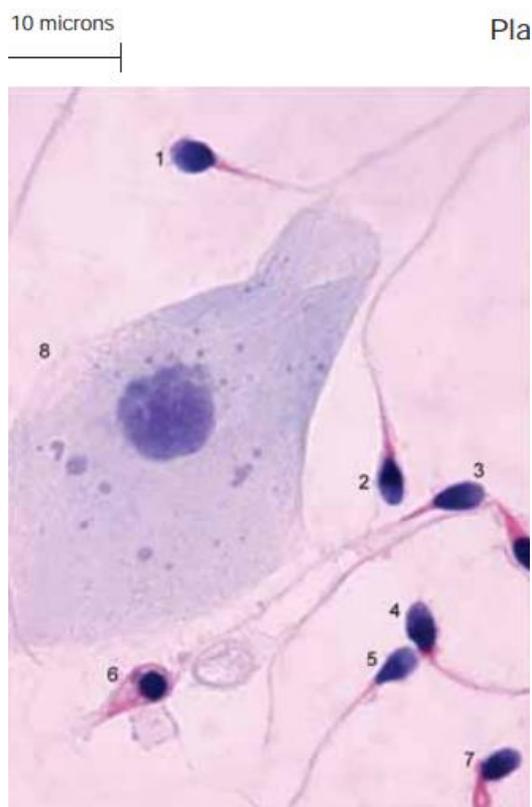
#### ***3.6.2 Morfología espermática***

Se tomó una alícuota de la muestra y se la colocó sobre un portaobjetos (limpio) para realizar un extendido; el mismo fue rotulado con el número de paciente y fecha correspondiente. Se dejó secar el preparado a

temperatura ambiente (TA) y se prosiguió fijando la muestra según especificaciones del fabricante (Color Fast, Biopack, Argentina), sumergiendo el vidrio en alcohol puro (100%) por 10 segundos. Posteriormente, se realizó la tinción pertinente a fin de establecer la morfología espermática según el criterio estricto (OMS 2010), solución A: 20 segundos, solución B: 20 segundos. Finalmente, se lavó el preparado con agua corriente dado a que el pH de la misma hace que el colorante *vire* (Figura 7).

Se evaluaron en 200 espermatozoides los siguientes parámetros utilizando un microscopio óptico 1000X, bajo aceite de inmersión:

- Cabeza: forma (debe ser oval para ser considerada normal), largo y ancho (considerando normal 3,5-5,0  $\mu\text{m}$  y 2,5-3,5  $\mu\text{m}$ , correspondientemente), presencia de vacuolas (siendo normal  $\leq 2$  pequeñas en una cabeza normal).
- Acrosoma: normal (corresponde a 2/3 de la cabeza), reducido, ausente.
- Cuello: debe nacer desde la pieza media con una inserción de 90° y poseer 7  $\mu\text{m}$  de largo y 1  $\mu\text{m}$  de ancho. Se considera aumentado si es de  $>1$   $\mu\text{m}$  de ancho y/o más alto y reducido si es de  $<1$   $\mu\text{m}$  de ancho y/o corto.
- Cola: debe presentar un ondulado razonable, se evalúa su longitud y forma.



**Figura 7.** Visualización de un extendido de muestra seminal para la observación de la morfología espermática según el criterio de Kruger. Formas normales (#1, #2, #3), formas anormales (#4, #5 y #7), sin clasificación (#6). Fuente. OMS 2010

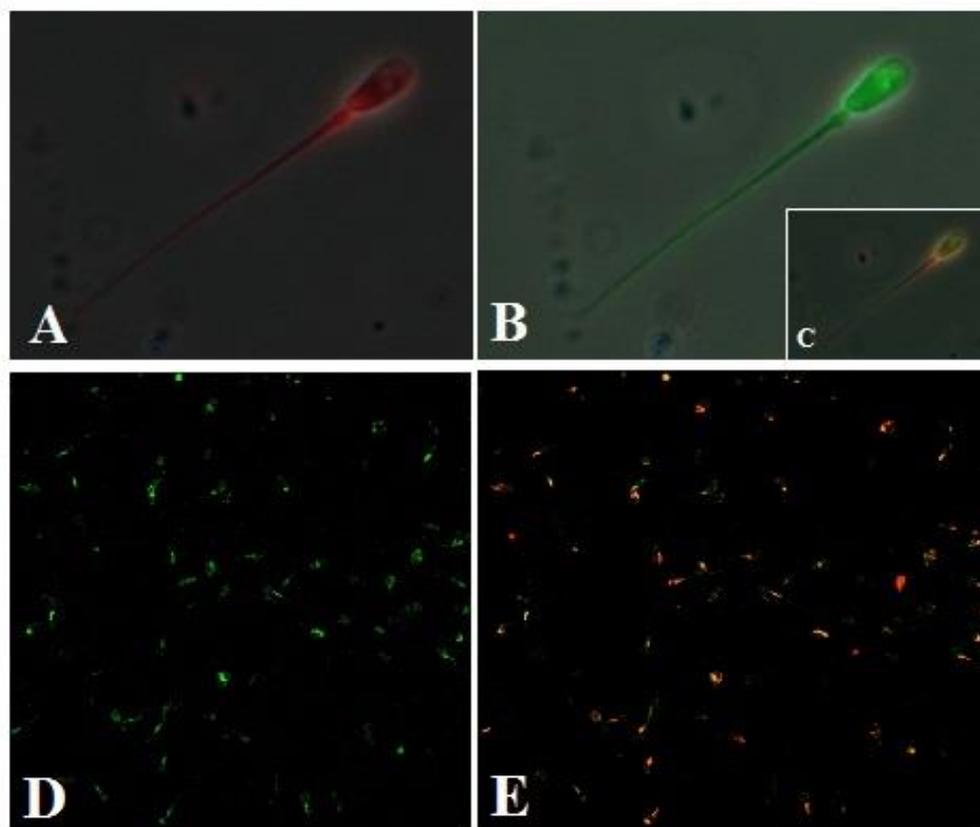
### 3.6.3 Daño oxidativo

#### a) *Evaluación y cuantificación de la peroxidación lipídica en la membrana espermática en espermatozoides humanos*

En nuestro trabajo visualizamos la peroxidación lipídica en la membrana de espermatozoides humanos utilizando el fluoróforo BODIPY 581/591 C11 (Life Technologies), el cual se evaluó por microscopía de fluorescencia. BODIPY es una sonda análoga a los ácidos grasos que emite fluorescencia cuando se intercala dentro de la membrana espermática y va desde el color rojo al verde cuando existe peroxidación lipídica. Tiene su máxima excitación desde 500 hasta los 650 nm, y la emisión máxima es desde los 510 nm hasta los 665 nm.

En primer lugar, se empleó una concentración de 2 millones de espermatozoides por mililitro. Luego se re-suspendió en 1 mL de medio H-HTF (Medio tubárico humano) (Irvine, Scientific). Posteriormente se agregó 1uL de BODIPY C11 para lograr una concentración final de 5Mm, y se incubó por 45minutos a 37°C. Posteriormente se centrifugó y descartó el sobrenadante hasta obtener un “pellet”, el cual se re-suspendió en 100uL de H-HTF. Finalmente, se tomaron 5uL del *pellet* y junto con 5uL de medio de montaje (Vectashield H-1000) fueron colocados sobre un portaobjeto para su visualización en el microscopio de fluorescencia. El control positivo de esta técnica implicó la incubación de espermatozoides con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) por 30 minutos.

Se realizó un recuento de al menos 200 espermatozoides, evaluándose como positivos aquellos espermatozoides que evidencian peroxidación en su membrana plasmática y por lo tanto emitieron fluorescencia de color verde. Aquellos espermatozoides que no poseían su membrana lipídica peroxidada se observaron de color rojo (Figura 8).



**Figura 8.** BODIPY<sup>581/591</sup> C<sub>11</sub>. Espermatozoides humanos marcados con BODIPY, en donde se muestra: A) Tinción de emisión 560 nm de color rojo, utilizada para el conteo total de espermatozoides, B) Tinción de emisión 520nm de color verde, para marcación positiva de peroxidación lipídica en la membrana plasmática, C) Unión de ambos canales (color amarillo) D) Marcación positiva en los espermatozoides incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5mM) y E) Unión de los canales rojo y verde (amarillo corresponde a espermatozoides peroxidados, rojo corresponde a espermatozoides normales).

*b) Determinación y semi-cuantificación del 8-OHDG y p53 por SDS-PAGE y Western blot*

Las proteínas suelen tener carga neta; por lo tanto, si se aplica un campo eléctrico a una solución que contenga una mezcla de proteínas, estas migrarán a una velocidad que dependerá de su carga neta, forma y peso molecular. Esta técnica es conocida como electroforesis. Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre en soportes sólidos, generalmente para separar una mezcla de proteínas el soporte de elección son los geles de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida son químicamente inertes y se preparan fácilmente por polimerización de monómeros de acrilamida. El polímero forma una red porosa que actúa como un tamiz que potencia la separación de las moléculas.

El sds-page es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre indica que la electroforesis en geles de poliacrilamida se realiza en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) un detergente iónico que se une a las proteínas y es capaz de romper todas las interacciones no covalentes de las proteínas. Además, las proteínas a analizar se disuelven en un agente reductor de puentes disulfuro como pueden ser el ditioneitol (DTT) o el  $\beta$ -mercaptoetanol. De esta manera las proteínas se desnaturalizan y son separadas en sus polipéptidos constitutivos (en caso de tener estructura cuaternaria).

El SDS es un detergente desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas con una relación constante a de SDS por gramo de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena (1:2). Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas con SDS migren hacia el ánodo.

En estas condiciones todas las moléculas tienen la misma forma, en tanto que su carga es proporcional a su tamaño. Por lo tanto, la separación de las

proteínas en un campo eléctrico ya no será dependiente de estos dos factores. Sin embargo, al estar migrando dentro de una red porosa, las proteínas de menor peso molecular se desplazarán más fácil y rápido, en tanto que las de mayor peso molecular quedarán más retrasadas. En consecuencia, la separación de los complejos SDS-proteína es proporcional solo al tamaño de la proteína.

Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos, un marcador o "marker". Las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular. Esta técnica permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de PM conocido. Estas determinaciones poseen un margen de error de alrededor del 10%. La determinación del PM de proteínas mediante la separación en geles de poliacrilamida con SDS es válida cuando se analizan cadenas proteicas individuales (subunidades), en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y, por ende, se ha distendido toda la cadena proteica para su interacción con el SDS. La movilidad electroforética relativa ( $R_f$ ) es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El  $R_f$  se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol (frente de corrida) o el largo del gel.

La transferencia de proteínas o "blotting" supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección, empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de membranas. En el Western Blot las proteínas son separadas en primer lugar mediante en electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y posteriormente se transfieren a una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel.

El procedimiento de “*blotting*” constó de cinco etapas:

1-Inmovilización de proteínas sobre la membrana, mediante electrotransferencia. En este método las proteínas fueron transferidas electroforéticamente desde el gel a la membrana. Se construyó lo que se conoce como “sándwich” donde se apilaron sucesivamente una esponja plana, un papel absorbente, el gel, la membrana sintética, más papel y finalmente otra esponja plana. Todo este conjunto debe estar embebido en solución de buffer de transferencia (para obtener una solución de continuidad que permita la conducción de la corriente eléctrica), se introdujo en una cubeta con el mismo buffer y dos electrodos planos. Se dispuso de tal forma que el gel quedó hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+). Se aplicó una diferencia de potencial y, debido a que la carga neta de las proteínas en el caso del SDS-PAGE es negativa, estas migraron desde el gel hacia la membrana donde quedaron retenidas.

Una vez realizada la transferencia, la membrana se analizó inmediatamente o en algunos casos fueron conservadas en frío (2 a 8 °C) para su posterior uso.

2- Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana. Una etapa común a todos los procedimientos de inmunodetección es lo se denomina “bloqueo de la membrana” con el objeto de prevenir la unión no específica de anticuerpos a la membrana con el riesgo de tener un elevado número de falsos positivos (“background”). Las dos soluciones de bloqueo que son más compatibles con casi cualquier sistema de detección, son las soluciones de leche desnatada y las de albumina sérica bovina (BSA). La membrana se incubó por 1 hora en solución de bloqueo al 5% de leche.

3- Incubación de la membrana con anticuerpos primarios contra la/s proteína/s de interés. El tipo de anticuerpos empleado en la detección de las proteínas transferidas a filtro no es determinante. Existen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales con alta especificidad y sensibilidad. Sin embargo, los monoclonales se pueden obtener en mayor

cantidad y mantienen siempre sus propiedades de reconocimiento independientemente del lote, pero son mucho más costosos.

En nuestro ensayo, se preparó una solución del anticuerpo primario: 8OH DG (8 hidroxideoxiguanosina) (1:1000) (Cell Signaling Technology) (hecho en conejo), y P53 (fosforilado en serina 15) (1:1000) (Ab-Cam) (hecho en ratón), por separado en solución de bloqueo (+leche al 5%), y se incubó la membrana durante toda la noche en agitación a 4°C.

4-Incubación de la membrana con anticuerpos secundarios. Como anticuerpos secundarios se suelen emplear aquellos que reconocen a las inmunoglobulinas (es decir, al anticuerpo primario). Estos anticuerpos tienen unidos en forma covalente una enzima que será utilizada a posteriori para evidenciar la presencia de la proteína a identificar.

Para nuestro ensayo, previo lavado con solución del bloqueo (sin leche) (3 veces 5 minutos cada una), se preparó una dilución del anticuerpo secundario (anti conejo/ratón) (+HRP) en la solución de bloqueo (+leche 5%) (1:2000), y se incubaron las membranas por dos horas a temperatura ambiente bajo agitación.

5- Sistema de revelado de las bandas de proteínas marcadas con los anticuerpos. Uno de los sistemas de revelados empleados en Western Blotting, y el usado en el presente trabajo, es mediante enzimas. Estas enzimas están unidas como se explicó anteriormente, covalentemente al anticuerpo secundario. Las mismas catalizan una reacción en la que se forma un precipitado coloreado o bien se emite luz. La peroxidasa de rábano (HRP) y la fosfatasa alcalina, se emplean con gran frecuencia. Se dispone de sustratos para ambas enzimas, así como de sustratos quimio luminiscentes que permiten obtener una banda en una placa radiográfica.

En resumen, en el estudio realizado las muestras de espermatozoides se llevaron a concentraciones aproximadas de 5 millones por mililitro. Cada muestra fue hervida durante 10 minutos con buffer de muestra 4X

Laemmli. Para la preparación del SDS-PAGE, se tomó lo correspondiente a 0,25 millones de espermatozoides por mililitro los cuales se sembraron en gel de poliacrilamida SDS al 10%, la corrida se realizó a 120-125 V para ser luego transferidas a la membrana de polivinilideno difluorida (PVDF) por 1 h a 100 V constantes. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con leche (5%) en TBS-twin 0.5% para ser luego incubadas con los anticuerpos: p53 (1:1000) y 8OHdG (1:1000), y luego ser incubados con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (1:2000) (anti-conejo / ratón). Finalmente, el revelado de las membranas se realizó mediante quimio-luminiscencia (LuminGLO), en el cual el anticuerpo secundario está asociado a la peroxidasa y se detectó por medio del sustrato ECL y una reacción que emite una longitud de onda de 428nm.

Las imágenes, luego del revelado, fueron grabadas usando el sistema de imágenes UMAX Magic Scan V4.4. Los análisis densitométricos de las imágenes se realizó empleando el sistema NIS-Elements BR Imaging Software v.300 y fueron expresados como intensidad relativa media luego de los ajustes a la concentración espermática. Los pesos moleculares de las proteínas espermáticas fueron detectados por comparación con los pesos moleculares de los estándares pre-teñidos.

#### ***3.6.4 Evaluación de la apoptosis***

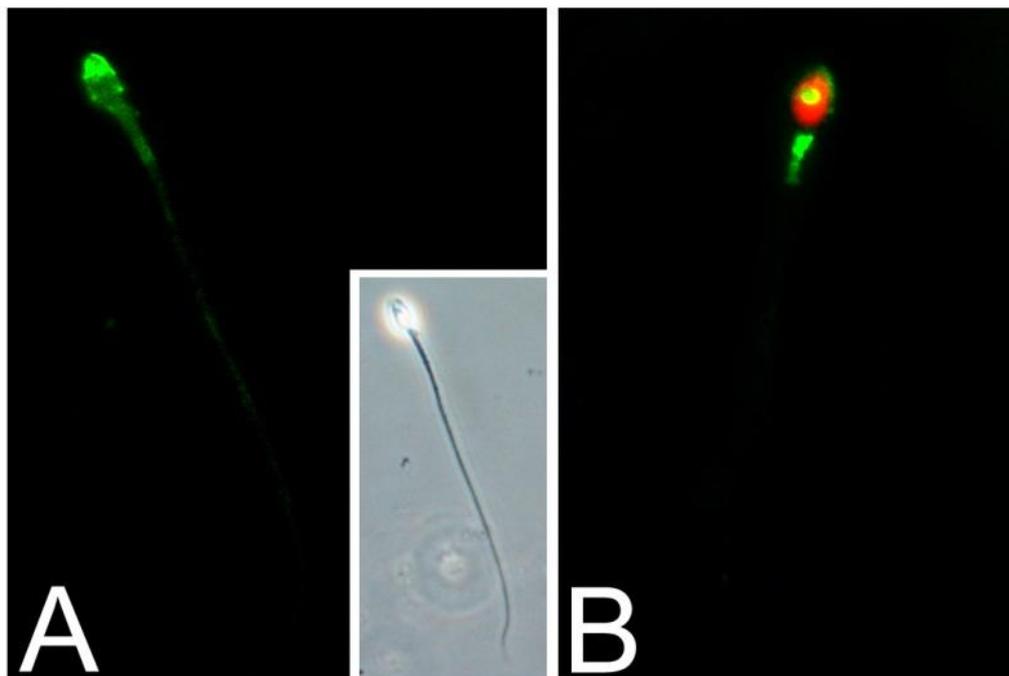
##### ***a) Evaluación y cuantificación de la externalización de la fosfatidilserina en espermatozoides humanos***

En las células apoptóticas se producen cambios en la simetría de los fosfolípidos de membrana. La bicapa lipídica que forma la membrana plasmática de la célula tiene una composición y orientación determinada. De los fosfolípidos que forman la bicapa, los que contienen colina, esfingomiolina y fosfatidilcolina, están orientados al exterior, mientras que la mayoría de los aminofosfolípidos, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, están orientados hacia el interior.

Durante la apoptosis, ocurre una pérdida de la asimetría de la membrana y por tanto una externalización de fosfatidilserina como uno de los eventos más precoces. Este evento es muy importante para el proceso general de la apoptosis ya que "marca" a las células para su posterior fagocitosis.

La Anexina V es una molécula, calcio dependiente, que se une con una alta afinidad a la fosfatidilserina y puede utilizarse para detectar dicho evento de translocación. El fluoróforo (FITC) unido a Anexina V, que emite luz verde, sirve como una sonda fluorescente para visualizar las células apoptóticas. Las muestras también han sido incubadas con yoduro de propidio (IP) un colorante vital no permeable. Por lo tanto, cuando la membrana plasmática pierde su integridad, el IP es incorporado por la célula emitiendo un color rojo fluorescente.

Para la observación de la externalización de fosfatidilserina en la membrana del espermatozoide, se trabajó con una concentración 1 millón de espermatozoides por mililitro. Luego se agregó 500uL de solución de "binding buffer" (Abcam), y a continuación 5uL de Ioduro de Propidio y 5uL de Anexina V. Posteriormente se centrifugó por cinco minutos a 300g y se tomó 5uL del "pellet" y 5uL de medio de montaje (Vectashield H-1000), y se montó sobre un portaobjeto para su visualización en el microscopio de fluorescencia (Figura 9).



**Figura 9.** Espermatozoides humanos marcados con Anexina V/ Ioduro de propidio. A) IP-/Anexina V+ (corresponde a un espermatozoide con inicio de apoptosis) (recuadro el mismo espermatozoide en campo claro) y B) IP+/Anexina V+ (corresponde a un espermatozoide muerto).

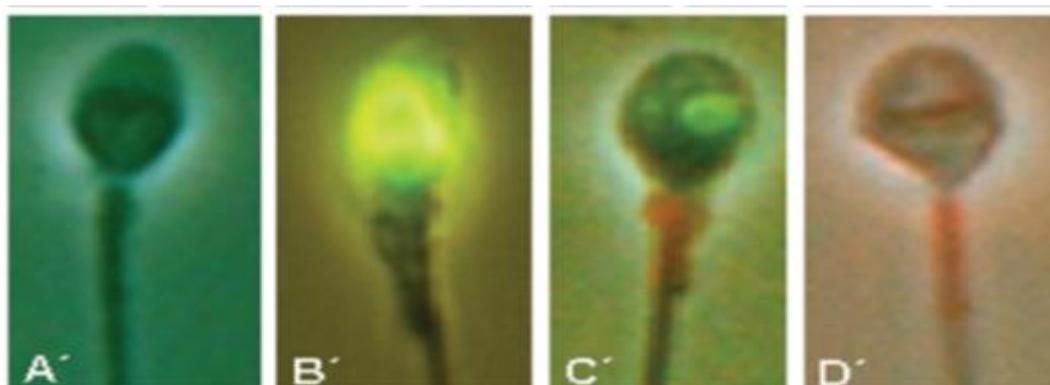
*b) Determinación y cuantificación de caspasa 3 activa (CC3) en espermatozoides humanos*

Se fijó una alícuota de espermatozoides (5 millones) con formaldehído al 2%. Luego de la fijación se lavó cada fracción con PBS 1X para retirar el exceso de fijador y de cada muestra se colocó una alícuota un “slide multi spot” (Cell Point Scientific, Inc.), se dejó decantar a temperatura ambiente por 45 minutos. Luego se retiró el exceso de PBS 1X y se procedió a permeabilizar las muestras agregando metanol frío (Merck 1.06009.1011) por 2-3 minutos, seguidamente se lavó cuidadosamente con PBS 1X procurando retirar muy bien el exceso de metanol. Sobre cada spot se colocó 25  $\mu$ l de una solución del anticuerpo primario anti-caspasa-3 activa (1:100) (Cell Signaling Technology) en buffer de bloqueo (Suero albúmina bovina 0,3%, suero fetal bovino 1%, gentamicina 0,5%, azida sódica 2mM en PBS 1X) y se dejó a 4°C por toda la noche. Al día siguiente se lavó 3

veces por 5 minutos en PBS 1X y se agregó 25  $\mu$ l de la solución del anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 anti-conejo (Molecular Probes). La incubación se realizó por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS 1X y se montó con Vectashield H-1000 (Vector Laboratories Inc., CA) para ser evaluado por microscopía de epifluorescencia.

Se observaron aproximadamente 500 espermatozoides de cada muestra. El resultado positivo de este ensayo se evidenció con la presencia de marcación roja en la región del cuello espermático (Figura 10).

Este procedimiento contó con un control negativo en el cual se omitió el anticuerpo primario anti-caspasa-3 activa.



**Figura 10.** Ensayo Caspasa 3 activa + TUNEL. En A` se puede observar un espermatozoide negativo para Caspasa y TUNEL. En B` se observa un espermatozoide positivo para TUNEL y negativo para Caspasa 3 activa. En C` se visualiza un espermatozoide positivo para ambas, la marcación de Caspasa 3 activa se localiza en la región del cuello espermático (color rojo). En D` se observa un espermatozoide marcado sólo para Caspasa 3 activa.

### ***3.6.5 Estabilidad del núcleo espermático***

#### ***a) Determinación y cuantificación de la fragmentación del ADN espermático (TUNEL) en espermatozoides humanos***

El clivaje de ADN genómico puede producir, roturas de tipo doble cadena, fragmentos de bajo peso molecular de ADN, así como también cortes de simple cadena (“nicks”) de alto peso molecular.

El método de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase- mediated dUTP nick end labeling) es un ensayo in situ para detectar los extremos 3'-OH libres en el ADN, que quedan expuestos durante el clivaje producto de la apoptosis.

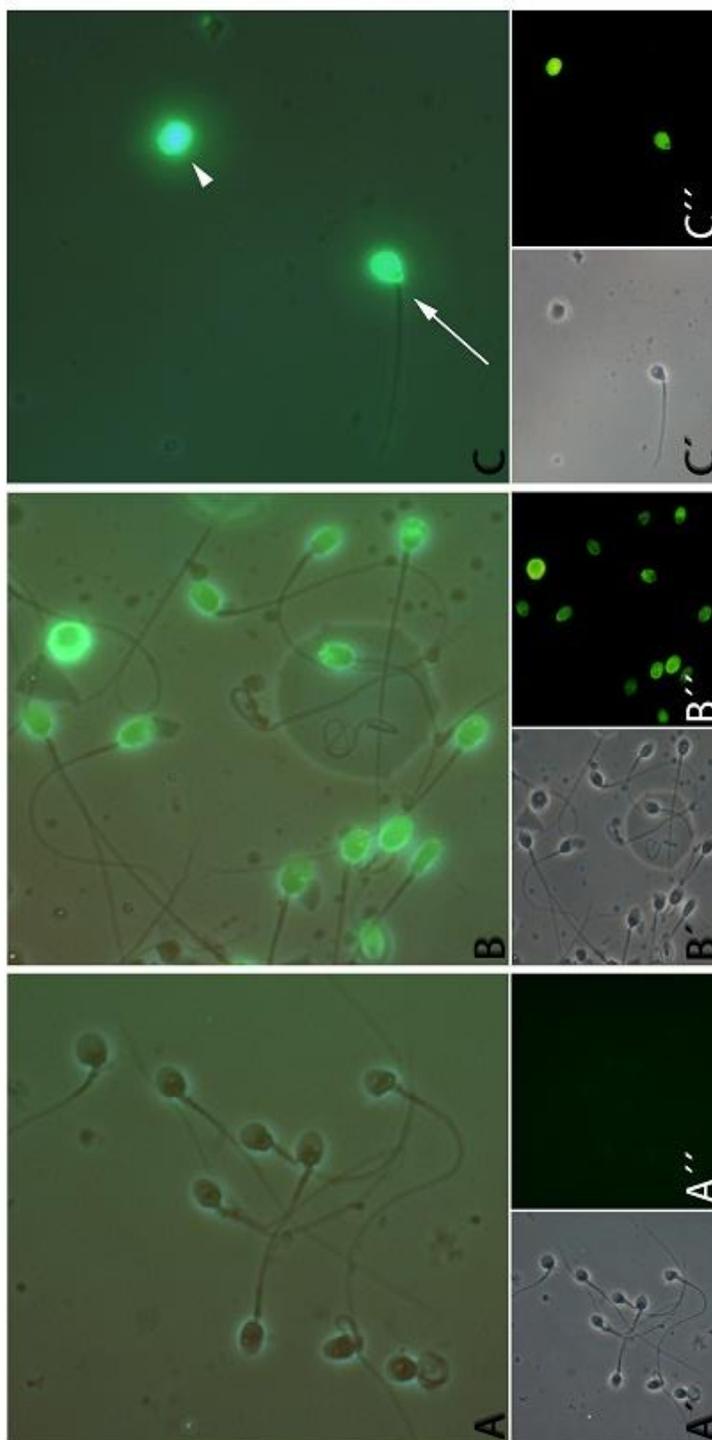
En primer lugar, se realiza el marcado de las cadenas rotas de ADN con extremos 3-OH libres, por medio de la enzima Deoxinucleotidil Transferasa Terminal (TdT) quien cataliza la polimerización de nucleótidos (dUTPs) que están marcados secundariamente por ejemplo con un fluoróforo (FITC). La uridina es un análogo de las bases del ADN con propiedades fluorescentes. En un segundo paso los polímeros de nucleótidos marcados son detectados y pueden ser cuantificados por microscopía de fluorescencia o Citometría de flujo.

Para el ensayo de TUNEL se trabajó con una alícuota de espermatozoides de una concentración de 5 millones de espermatozoides por mililitro, que luego se fijó con formaldehído al 2% en PBS. A continuación, se sembraron las muestras en un portaobjetos “multi-spot” previamente tratado con solución de poli-L-lisina al 0,1% durante 5 minutos y se dejó en cámara húmeda a 4°C overnight. Al día siguiente se lavó cada spot, con la muestra, con solución de PBS, y se realizó la permeabilización de las células con una solución de metanol frío por 1 minuto. Se lavó cada pocillo nuevamente con solución de PBS, y se agregó la mezcla del reactivo de TUNEL (respetando la proporción 1:9 de Enzima/Label, respectivamente) por pocillo y se dejó incubar por 1 hora a 37°C en cámara húmeda.

Posteriormente se retiró el exceso con solución de PBS, dejando secar a temperatura ambiente, y agregando luego 5uL de medio de montaje para fluorescencia Vectashield H-1000. Por último, se observó en microscopio de fluorescencia 1000X en objetivo de aceite de inmersión.

Se observó cada célula espermática y se determinó si el ADN se encontraba intacto (en caso de que no emita fluorescencia), o bien fragmentado (que se observara con un color verde fluorescente nuclear intenso).

Como control positivo luego del primer lavado, se incubó una muestra con DNAsa 1U/mL por 20 minutos a 37°C y como control negativo se agregó la solución de Label sin usar la solución de enzima en la reacción) (Figura 11).



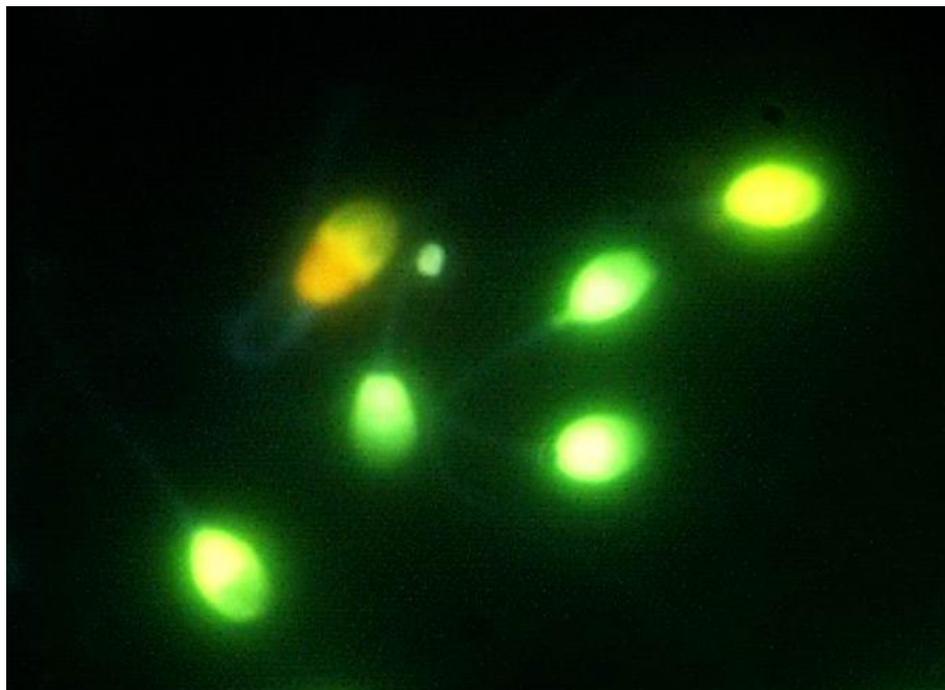
**Figura 11.** Ensayo TUNEL. El control negativo fue realizado omitiendo solución de “enzima” (A) bajo fluorescencia verde; A', contraste de fase y A'' campo oscuro + fluorescencia). El control positivo se realizó por incubación con DNasa (B, fluorescencia verde - 100% positivas, B' contraste de fase y B'' campo oscuro + fluorescencia). Sólo los espermatozoides completos (flecha) se consideraron para la evaluación de TUNEL, por el contrario, las cabezas aisladas fueron excluidas (punta de flecha).

***b) Determinación y cuantificación del estado de compactación de la cromatina***

Se utilizó el marcaje mediante el fluoróforo naranja de acridina a fin de conocer el grado de compactación de la hebra de ADN. Los portaobjetos utilizados para el estudio estuvieron previamente almacenados *overnight* en metanol frío y luego lavados con agua de irrigación. Una vez secos los vidrios, se prosiguió colocando sobre ellos los 20  $\mu$ L de muestra (previamente homogeneizada) para así extenderla.

Se dejó secar por 20min y luego se colocaron los vidrios en Carnoy (metanol + ácido acético glacial en proporciones 3:1) por, al menos 2hs con el fin de fijar la muestra. Así, se prosiguió lavando los preparados con agua de irrigación para luego continuar con la tinción propiamente dicha. Con la ayuda de una pipeta Pasteur plástica, se colocó el volumen suficiente de colorante a fin de cubrir el portaobjetos. Se dejó actuar por 7 min y luego se lavó, nuevamente, con agua de irrigación.

Una vez secos los vidrios, a temperatura ambiente, utilizando un microscopio de fluorescencia y un contador digital, se realizó el conteo y lectura de los preparados. Se observó a 60X-100X (según las características de la muestra) utilizando aceite de inmersión. Se registraron 500 espermatozoides por muestra; tal como se observa en la Figura 12, se consideraron positivos aquellos espermatozoides que presentaron una emisión fluorescente en la gama de roja-amarilla y negativos aquellos que presentaron una emisión fluorescente verde.



**Figura 12.** Marcación con naranja de acridina. Espermatozoides con núcleo verde (ADN intacto), espermatozoides con núcleo anaranjado (ADN alterado en su compactación).

### 3.7 Infertilidad masculina

#### 3.7.1 Datos clínicos de infertilidad masculina

Se procedió a registrar todos los datos clínicos de la historia clínica para realizar estudios de correlación con la fragmentación del ADN espermático. Los datos registrados fueron: fertilidad comprobada, número de hijos, años de infertilidad, edad, estudios hormonales (TSH, FSH, LH y Prl), diagnóstico de: dislipemia, hipertensión, diabetes; peso, talla, índice de masa corporal, estudios infectológicos, antecedentes de cirugías, tabaquismo, ingesta de medicación por algún tratamiento prolongado (ANEXO III). Las parejas fueron incluidas según su diagnóstico en los siguientes grupos: disminución de la reserva ovárica (DRO), edad reproductiva avanzada (ERA), factor masculino (FM), abortadora

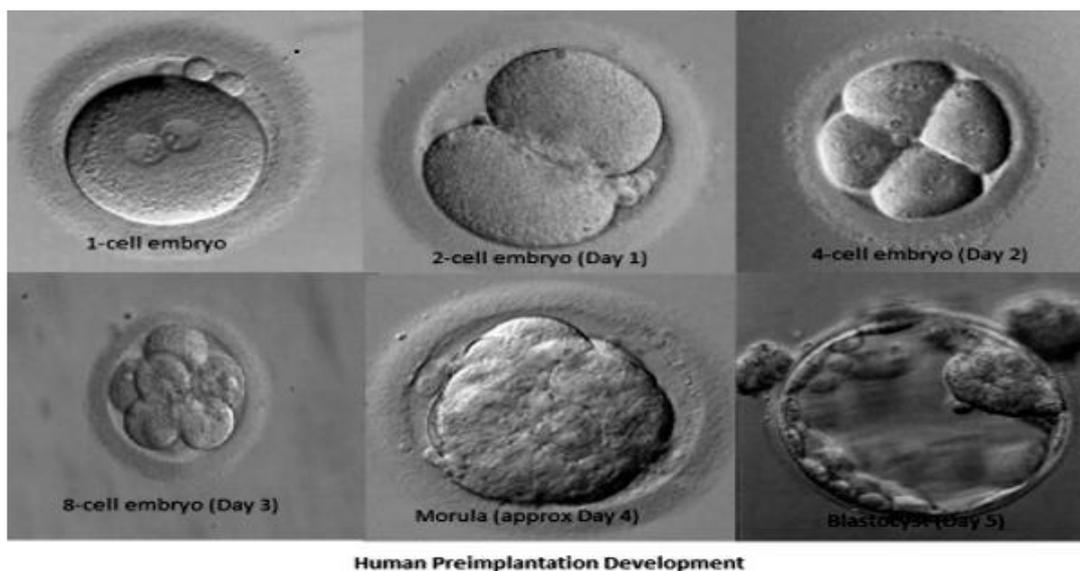
recurrente (ABT), baja complejidad fallida (BCF), factor tubo-peritoneal (FTP), y esterilidad sin causa aparente (ESCA)

### ***3.7.2 Calidad embrionaria y embarazo por el factor masculino***

En esta etapa del estudio se incluyeron los tratamientos y embriones detenidos resultantes de los procedimientos de reproducción asistida. En esta etapa se evaluó la tasa de llegada al estadio de blastocisto (día quinto o sexto del desarrollo in vitro). Con el objetivo de evaluar el impacto del factor masculino sobre la llegada al estadio de blastocisto y tasa de embarazo, se trabajó con pacientes que realizaron tratamientos de fecundación in vitro con óvulos donados, mujeres jóvenes con buen pronóstico reproductivo. Las donantes de óvulos tuvieron que cumplir con los siguientes requisitos del programa de donación de óvulos: conteo de folículos antrales > 16 mm (este parámetro nos manifiesta la buena cantidad de óvulos a extraer), serología negativa, cariotipo normal y haber asistido a la consulta psicológica y genética para asesoramiento.

Para la obtención de los óvulos de las donantes, los donantes siguieron un protocolo de estimulación ovárica de antagonista de GnRH de forma flexible con una dosis diaria de 225-300 UI de una gonadotropina (Menopur®) (Ferring). Cuando el folículo principal alcanzó un diámetro de 14 mm, el antagonista de GnRH Orgalutran (MSD®) fue administrado diariamente hasta el día de la inyección del agonista de GnRH). Una vez que el folículo principal alcanzó 17-18 mm de diámetro y los niveles de estradiol fueron > +500 pg / mL, el acetato de leuprolide (Lupron®, 2 mg) se administró 36 horas antes de la recuperación de ovocitos. Los óvulos maduros (estadio de metafase II), 4 horas después de su captación, fueron utilizados para realizar el procedimiento de ICSI. La muestra de espermatozoides utilizada para el ICSI fue fijada con formaldehído al 2% para su posterior estudio por la técnica de TUNEL. Por otro lado, al día siguiente (18 horas después de ICSI), se evaluó la fecundación de los mismos. Los óvulos fecundados de forma normal se cultivaron in vitro por

5 a 6 días. Los embriones en estadio de blastocisto (Figura 13) se seleccionaron para su transferencia al útero de la receptora, y el resto de los embriones no transferidos se congelaron para su posterior uso. Así mismo, los embriones que quedaron detenidos en su desarrollo hacia el estadio de blastocisto fueron fijados con formaldehído para su posterior estudio. Las pacientes receptoras recibieron valerato de estradiol de forma oral (Ronfase®) 4 mg diarios desde el día 2 del ciclo menstrual. El día 10 del ciclo se realizó un examen de ultrasonido. Después de la confirmación por ultrasonido del grosor endometrial  $> 6$  mm y ausencia de actividad ovárica, se agregó progesterona (Utrogestan®) 600 mg diarios por vía vaginal durante 5 días antes de la transferencia ET y hasta 14 semanas después cuando el embarazo fue confirmado. La dosis de Ronfase se aumentó a 6 mg al día si el grosor endometrial fue inferior a 6 mm.



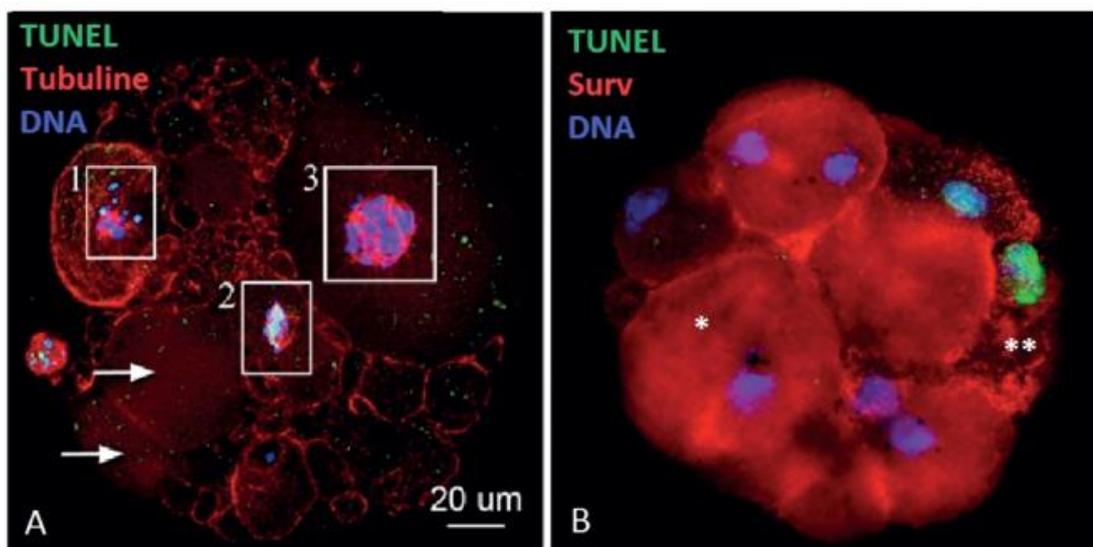
**Figura 13.** Estadios de desarrollo evaluados durante el cultivo in vitro de embriones humanos. Imagen superior izquierda corresponde a un óvulo fecundado normalmente (formación de 2 pronúcleos); imagen superior medio y derecha corresponden a un embrión de desarrollo de 48 horas en cultivo (2-4 células); imagen inferior izquierda corresponde a un embrión de 72 horas de desarrollo (8 células); imagen inferior medio corresponde a un embrión de 96 hora de desarrollo (mórula) y finalmente en la imagen inferior derecha corresponde a un embrión en estadio de blastocisto ( $> 120$  horas de desarrollo). *Fuente:* Concept Fertility Clinic.

Como se mencionó anteriormente, todos los embriones humanos restantes fueron donados para investigación con el consentimiento de las parejas sometidas a procedimientos reproducción. Ninguno de los embriones donados para este proyecto fueron transferidos a los destinatarios después de ICSI. Si no hubieran sido donados a esta investigación, estos embriones habrían sido descartados.

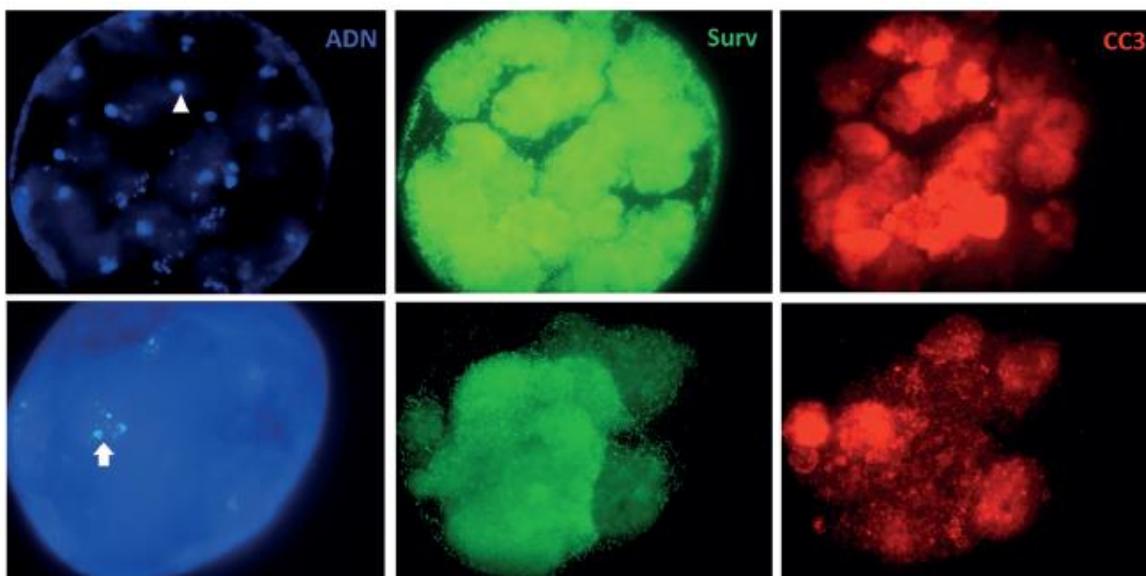
Luego de fijados los embriones, se evaluó la presencia de caspasa-3 (CC3) activa y Survivin (Surv): utilizando anticuerpo monoclonal para CC3 hecho en conejo (dil: 1: 100) Cell Signaling, EE. UU., y para Surv (monoclonal de ratón, dil: 1: 100, Novus Biologicals, EE. UU.). Como anticuerpos secundarios se empleó Alexa Fluor (Molecular Probes) (Invitrogen, Estados Unidos). El ensayo de TUNEL en los embriones (Roche, EE. UU.) fue realizado para detectar fragmentación de ADN. El colorante Hoechst 33258 (Sigma) se usó para la tinción de ADN.

Ciento ochenta y siete embriones fueron estudiados después de ICSI. Todos los embriones fueron procesados individualmente. La zona pelúcida fue ligeramente disuelta por incubación en solución ácida de Tyrode (Irvine Scientific, Estados Unidos), y luego los embriones fueron procesados por inmunocitoquímica (ICC). Se realizó la detección del daño celular y apoptosis. Los embriones humanos se fijaron durante 45 minutos en formaldehído al 2% y posteriormente lavados con PBS + 0.1% Tritón X-100 por 45 minutos adicionales. Después de la fijación y lavado, las muestras fueron bloqueadas durante al menos 1 h en PBS + 0.3% albúmina de suero bovino (BSA) + suero de ternera fetal al 1% antes de la incubación con el anticuerpo primario durante la noche a 4 ° C, posteriormente se procedió a lavar el anticuerpo primario, pasado ese tiempo, se incubaron los embriones con el anticuerpo secundario durante 2 horas a 37 ° C. Los embriones fueron lavados varias veces con PBS-BSA. Después del lavado, se incubaron en solución TUNEL durante 1 hora a 37 ° C. Finalmente los embriones fueron incubados con Hoechst 33258 para la detección de

ADN. Algunas imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal Olympus, con láseres para excitar 488-, 568- y 633 nm, luego las imágenes fueron procesadas con Adobe Photoshop C5; imágenes adicionales fueron capturadas con un Microscopio de fluorescencia Olympus BX40. Controles negativos se ejecutaron en ausencia de anticuerpos primarios. Este ensayo nos permitió determinar la activación citoplasmática de CC3 en los blastómeros de cada uno de los embriones (apoptosis); la activación de Surv significó que la célula realizó una estrategia para detener la muerte celular; TUNEL (positivo) significa que se había producido fragmentación del ADN (daño), pero ante la presencia de la condensación nuclear y TUNEL positivo significaron la evidencia final de la célula entró en muerte por apoptosis (Figuras 14 y 15).



**Figura 14.** Imágenes de microscopía confocal para la detección de Surv y TUNEL. En A, se puede observar blastómeros con el ADN fragmentado (1 y 2) y no fragmentado (3), así mismo se observan blastómeros sin ADN (flechas). En B, se pueden observar blastómeros positivos para Surv y negativos para TUNEL (\*), y blastómeros positivos para ambas marcaciones (\*\*).



**Figura 15.** Imágenes de microscopía de fluorescencia para la detección de Surv (verde) y caspasa 3 activa (CC3) (rojo) en embriones detenidos durante el desarrollo *in vitro*. La cabeza de flecha nos muestra la tinción del ADN, observándose la condensación del ADN (apoptosis), finalmente, la flecha nos muestra el ADN condensado y dañado (TUNEL positivo).

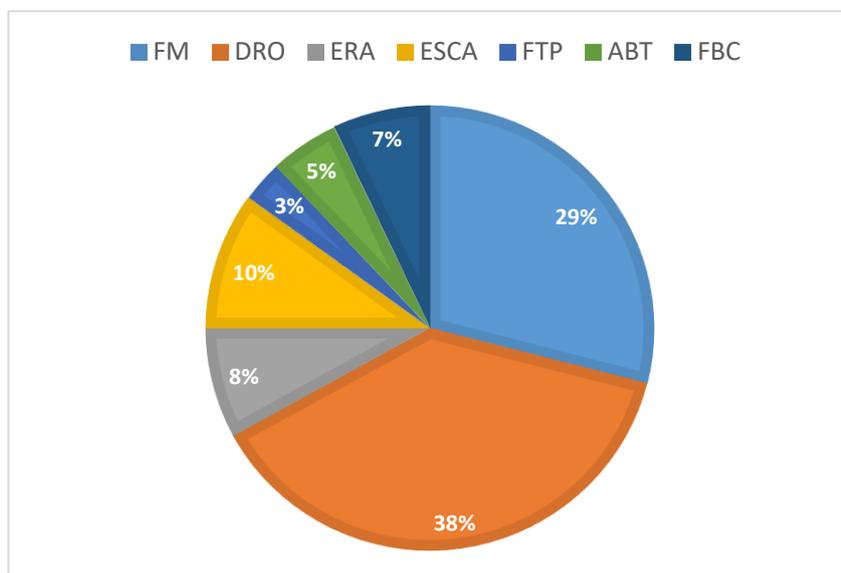
### 3.8 Análisis estadístico

En el presente estudio se emplearon el estadístico de Mann-Whitney para la comparación de medianas entre dos muestras y Kruskal-Wallis para la comparación entre más de dos grupos. Así mismo se realizó el análisis de correlación mediante el estadístico de Spearman, y la comparación de los coeficientes de correlación se realizó mediante la prueba Z. Para la comparación de variables no paramétricas de tipo categórica se empleó la prueba de Chi-cuadrado. La determinación del valor de corte fue realizada mediante el análisis de curva ROC (Receiver Operating Characteristic). En todos los casos se consideró el valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Resultados demográficos

En la figura 16 y cuadro 7 se muestra la distribución de los pacientes según la causa de infertilidad que los llevó a realizar los tratamientos de alta complejidad. Se puede observar que la mayor cantidad de pacientes reclutados pertenecían a los grupos que tienen como indicación factor masculino (29%) y la reserva ovárica disminuida (38%).

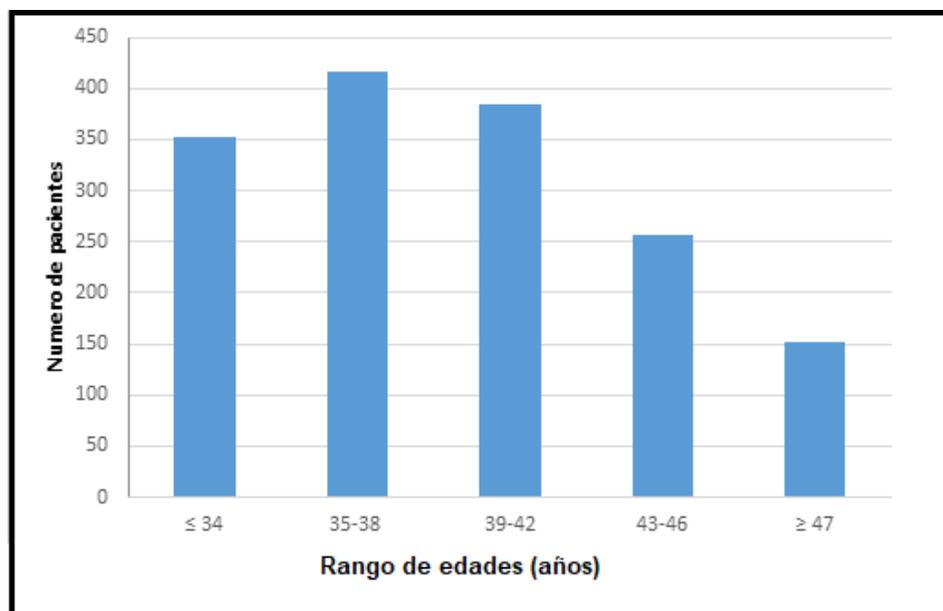


**Figura 16.** Prevalencia de causas de infertilidad en la población bajo estudio. (FM) factor masculino, (DRO) reserva ovárica disminuida, (ERA) edad reproductiva avanzada femenina, (ESCA) esterilidad sin causa aparente, (FTP) factor tubárico, (ABT) abortadora recurrente y (FBC) tratamientos de baja complejidad fallidos.

**Cuadro 7. Prevalencia (Número de casos y porcentajes) de causas de infertilidad en la población de estudio. (FM) factor masculino, (DRO) reserva ovárica disminuida, (ERA) edad reproductiva avanzada femenina, (ESCA) esterilidad sin causa aparente, (FTP) factor tubárico, (ABT) abortadora recurrente y (FBC) tratamientos de baja complejidad fallidos.**

	N	%
<b>FM</b>	459	29
<b>DRO</b>	594	38
<b>ERA</b>	108	8
<b>ESCA</b>	162	10
<b>FTP</b>	54	3
<b>ABT</b>	81	5
<b>FBC</b>	102	7
<b>TOTAL</b>	<b>1560</b>	<b>100</b>

En relación a los varones estudiados en el presente estudio, se establecieron cinco grupos en función de las edades de los mismos, con el fin de observar la predominancia etaria. La distribución de la población de hombres según su edad se observa en la Figura 17 y cuadro 8. Encontrando que la mayoría de los pacientes se encuentran entre 35-42 años.

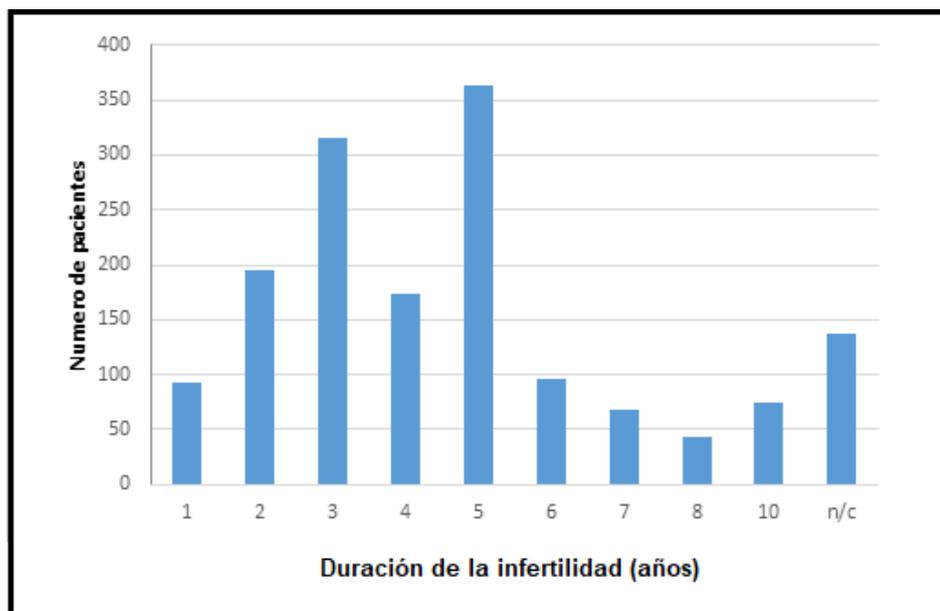


**Figura 17. Estratificación etaria en la población estudiada. Aquí están representados los rangos de edades versus el número de pacientes presentes en cada uno de los grupos.**

**Cuadro 8. Distribución etaria de los casos de varones infértiles incluidos en el estudio**

Edad (años)	N	%
≤ 34	352	23
35-38	416	27
39-42	384	25
43-46	256	16
≥ 47	152	9
<b>TOTAL</b>	<b>1560</b>	<b>100</b>

El siguiente análisis que realizamos en la población fue la cantidad en años de infertilidad. Se agruparon los pacientes en función de los años de infertilidad que llevaban con su actual pareja (Figura 18 y cuadro 9). Se puede distinguir que en nuestra población los años de infertilidad se encontraron mayoritariamente entre los 2-5 años.



**Figura 18. Distribución de la duración de años de infertilidad en la población. En esta figura están representados los años de infertilidad que transita la pareja y el número de pacientes.**

**Cuadro 9.** Tabla de distribución (Número de casos y porcentajes) de los años de infertilidad que cursaron los pacientes incluidos en el estudio. (n/c: consta en la historia clínica el dato específico)

Años infertilidad	N	%
1	93	6
2	195	13
3	315	20
4	174	11
5	364	23
6	96	6
7	68	4
8	44	3
10	74	5
n/c	137	9
<b>TOTAL</b>	<b>1560</b>	<b>100</b>

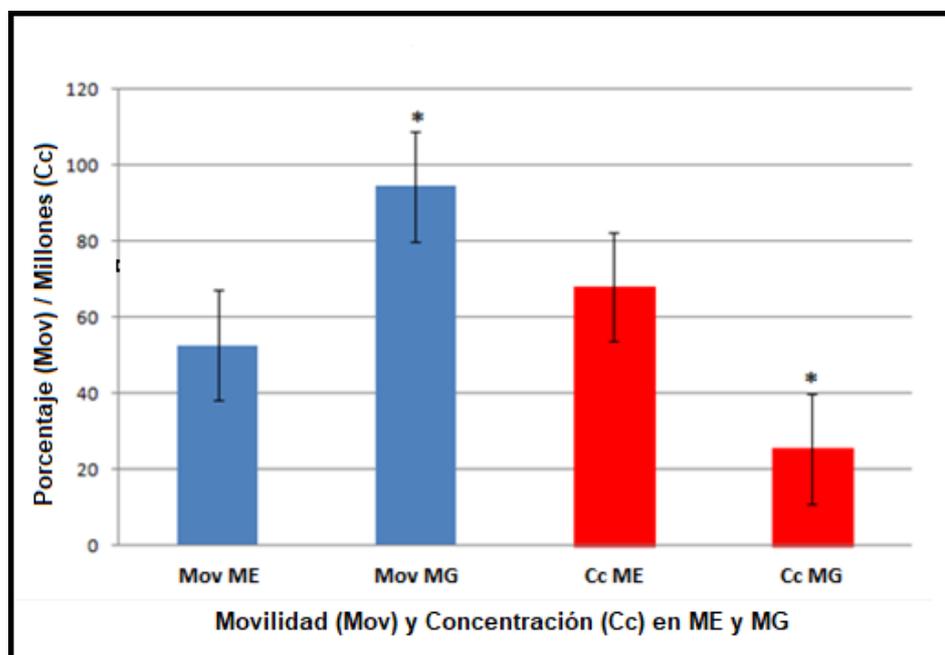
#### 4.2 Resultados sobre la calidad seminal y daño del ADN espermático

Los pacientes descritos previamente obtuvieron las muestras de semen según lo indicado en materiales y métodos, se procedió a procesar y evaluar las muestras totales, y a su vez se realizó la separación de espermatozoides móviles por la técnica de gradiente. Los resultados están representados en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Resultados de los valores de los parámetros seminales en la muestra entera (ME). Aquí se muestra el promedio, el desvío estándar (DS), el intervalo de confianza al 95% (CI), y los valores mínimos y máximos de cada parámetro seminal.

	Promedio	DS	IC 95%	Valor min	Valor max
<b>Volumen</b>	2.5	1.13	2.2-2.8	0.8	6
<b>pH</b>	7.5	0.5	7.4-7.7	6.5	8.5
<b>Concentración (millón/mL)</b>	67.9	42.1	55.9-80.1	8	185
<b>Movilidad (a+b) (%)</b>	52.7	20.7	46.7-58.6	20	72
<b>Morfología (%)</b>	9.3	6.3	7.5-11.2	0	16

En la figura 19 se muestran los resultados de la movilidad y concentración de la muestra total o entera (ME) y post gradiente (MG) de todos los pacientes. Evidenciándose que la técnica de gradiente fue eficiente para separar espermatozoides móviles (más del 90%). Sin embargo, la concentración recuperada (24,4 millones/mL) siempre fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a la concentración de la muestra total (66,2 millones/mL). Es importante resaltar que esta técnica de separación espermática fue efectiva, el test de fragmentación se debe realizar sobre la población de espermatozoides móviles cuando se considera desde un punto de vista clínico.

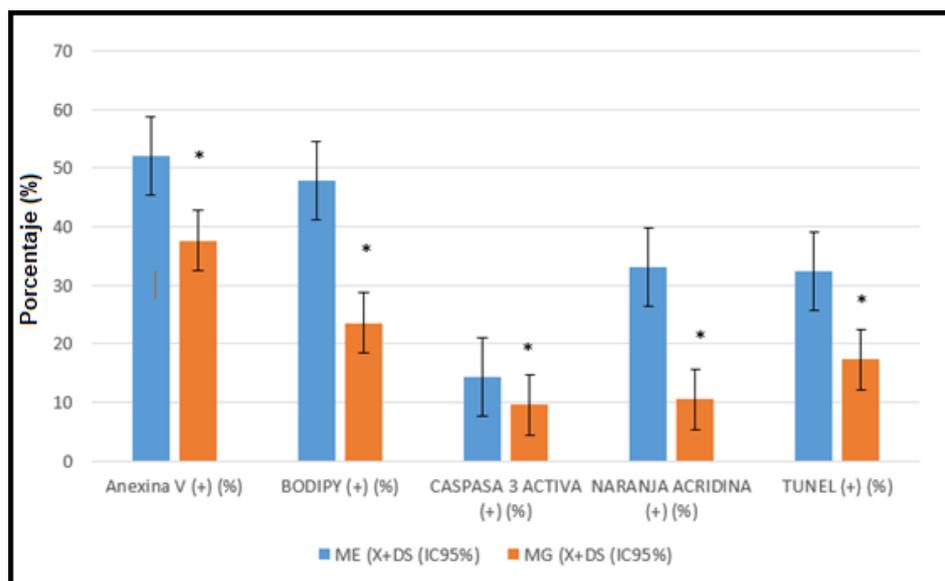


**Figura 19.** Resultados de la calidad seminal en los parámetros de movilidad (% a+b) (Mov) y concentración (Cc) (millones/mL) en la muestra entera (ME) vs. la muestra post gradiente (MG), ( $*p < 0.05$ )

Por otro lado, en esta sección, detallaremos los resultados en relación a las variables relacionadas al daño del ADN y los posibles mecanismos involucrados (daño oxidativo, apoptosis y la estabilidad de la cromatina), así, empezaremos con los datos obtenidos de cada una de las variables evaluadas por microscopía de fluorescencia (TUNEL, BODIPY, Anexina V y CC3) en las muestras de semen tanto en la muestra entera como en post gradiente se muestran a continuación en el cuadro 11 y figura 20. Se puede observar que existió una disminución significativa de los valores de las variables evaluadas en la muestra post-gradiente respecto a la muestra entera.

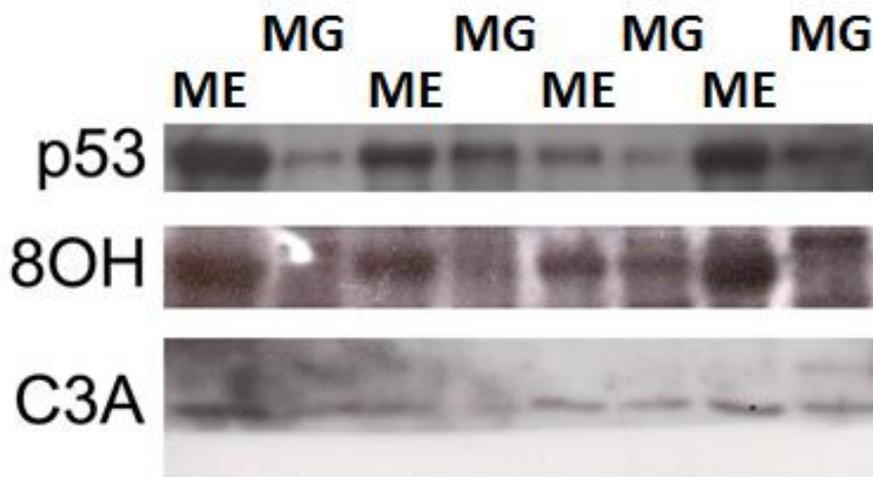
**Cuadro 11. Resultados de la calidad seminal y daño espermático evaluados por peroxidación lipídica, apoptosis y estabilidad del medio espermático en la muestra entera y post gradiente. Aquí se muestra el promedio, el desvío estándar (DS), el intervalo de confianza al 95% (IC95%).**

	ME (X+DS (IC95%))	MG (X+DS (IC95%))
<b>Apoptosis [Anexina V (+) (%)]</b>	52.1 ±18.1 (46.8-57.2)	37.6 ±21.2 (31.5-43.6)
<b>Peroxidación lipídica [BODIPY (+) (%)]</b>	47.8 ±16.4 (43.3-52.3)	23.6 ±10.9 (20.5-26.8)
<b>Apoptosis [CASPASA 3 ACTIVA (+) (%)]</b>	14.3 ±5.8 (12.1-16.4)	9.6 ±5.3 (7.2-9.6)
<b>Estabilidad del núcleo espermático [NARANJA ACRIDINA (+) (%)]</b>	33.2 ±8.2 (31.3-35.3)	10.5 ±7.2 (8.7-12.3)
<b>Estabilidad del núcleo espermático [TUNEL (+) (%)]</b>	32.3 ±16.4 (27.5-36.9)	17.3 ±10.4 (14.3-20.3)



**Figura 20.** Comparación de los marcadores (Anexina V, BODIPY, CC3, naranja de acridina y TUNEL) entre la ME vs MG evaluados por microscopía de fluorescencia (\* $p < 0.05$ ) (eje Y = porcentaje)

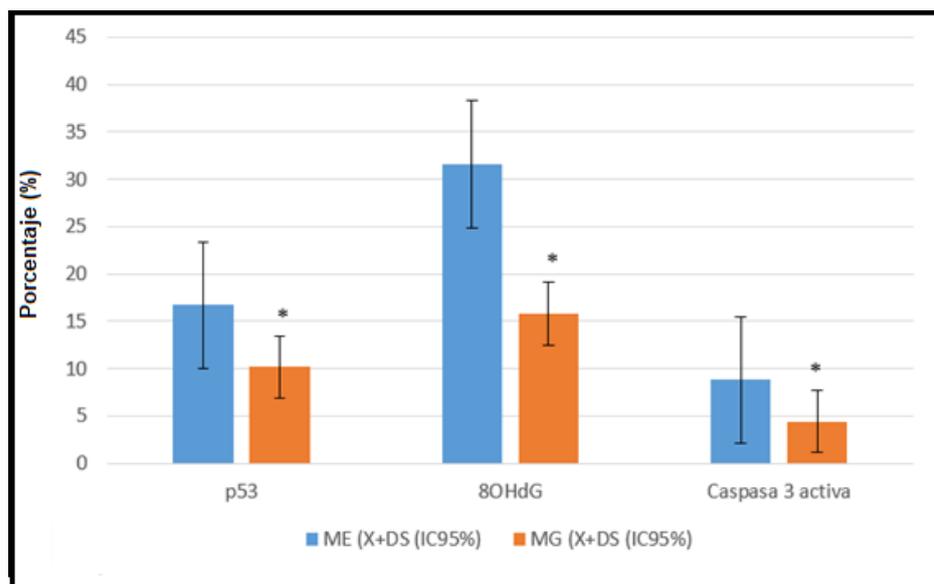
Así mismo, se analizaron los distintos marcadores para detectar oxidación de las bases del ADN (8OHdG), daño del ADN que involucra la vía de p53 (ser15) y la activación de Caspasa 3 activa (C3A) (Figura 21) por Western blot. Luego, mediante el análisis densitométrico, se determinó la cantidad relativa de Caspasa 3 activa, p53 y 8OHdG, y se compararon estos marcadores en la muestra total y post-gradiente. Al igual que en el caso anterior, luego del gradiente se observó una disminución significativa de los niveles de los tres marcadores (Cuadro 12, Figura 21 y 22).



**Figura 21.** Representación de una muestra (N=4) del estudio de Western blot para p53, 8 OHdG y Caspasa 3 activa en muestra entera (ME) vs. Post-gradiente (MG).

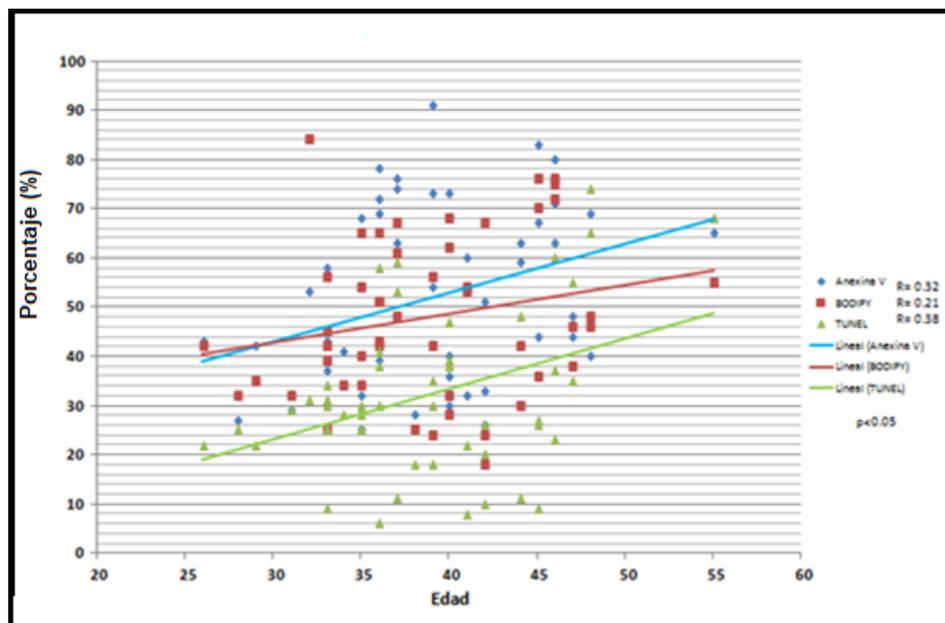
**Cuadro 12.** Resultados de los parámetros de daño oxidativo y apoptosis determinados por western blot determinados en las fracciones de muestra entera (ME) vs. Post gradiente (MG). Se describen el promedio (X), desvío estándar (DS) e intervalo de confianza al 95% (IC95%) para cada marcador.

	ME (X+DS (IC95%))	MG (X+DS (IC95%))
<b>p53</b>	16,7 ± 3,4 (15,1-18,5)	10,2 ± 2,9 (8,8-11,7)
<b>8OHdG</b>	31,6 ± 8,5 (27,4-35,9)	15,8 ± 6,1 (12,8-18,9)
<b>Caspasa 3 activa</b>	8.8 ± 3,1 (7,3-10,3)	4,4 ± 2,2 (3,3-5,5)



**Figura 22.** Comparación de los marcadores (p53, 8OHdG y CC3) entre la ME vs MG. Evaluados por western blot (\* $p < 0.05$ )

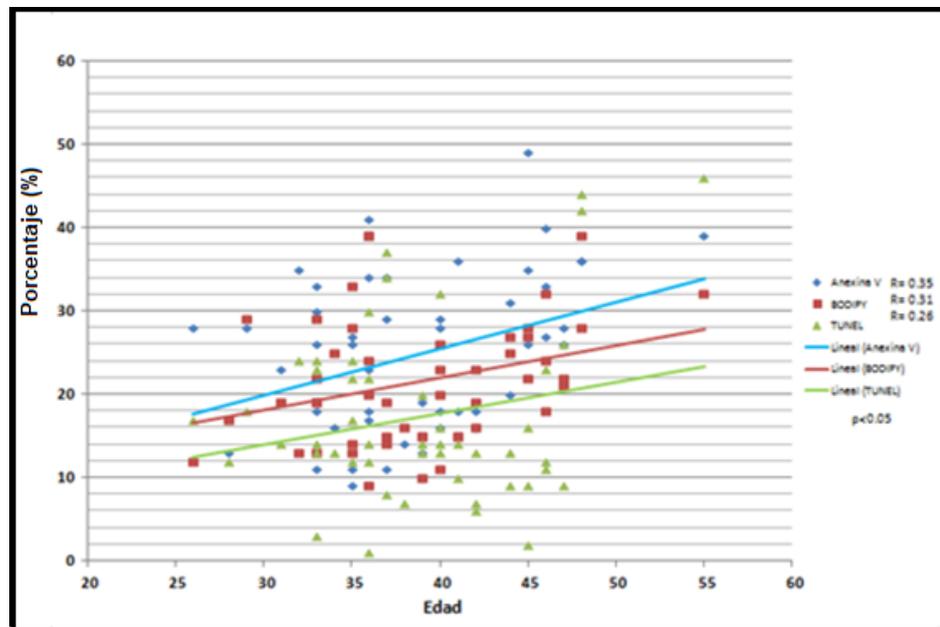
Seguidamente se efectuó el análisis de correlación entre los diferentes marcadores de estrés oxidativo, fragmentación del ADN y apoptosis con las variables edad, morfología espermática y movilidad. Los resultados se muestran en las siguientes Figuras.



**Figura 23.** Correlación de los marcadores, Anexina V, BODIPY y TUNEL con la variable edad en la fracción de muestra entera (ME).

Como se puede observar, la correlación entre los marcadores y la variable edad es positiva y significativa en todos los casos. Siendo el TUNEL el que presenta mayor valor de R ( $=0.38$ ), seguido por la Anexina V ( $R=0.32$ ) y finalmente el BODIPY ( $R=0.21$ ) (Figura 23).

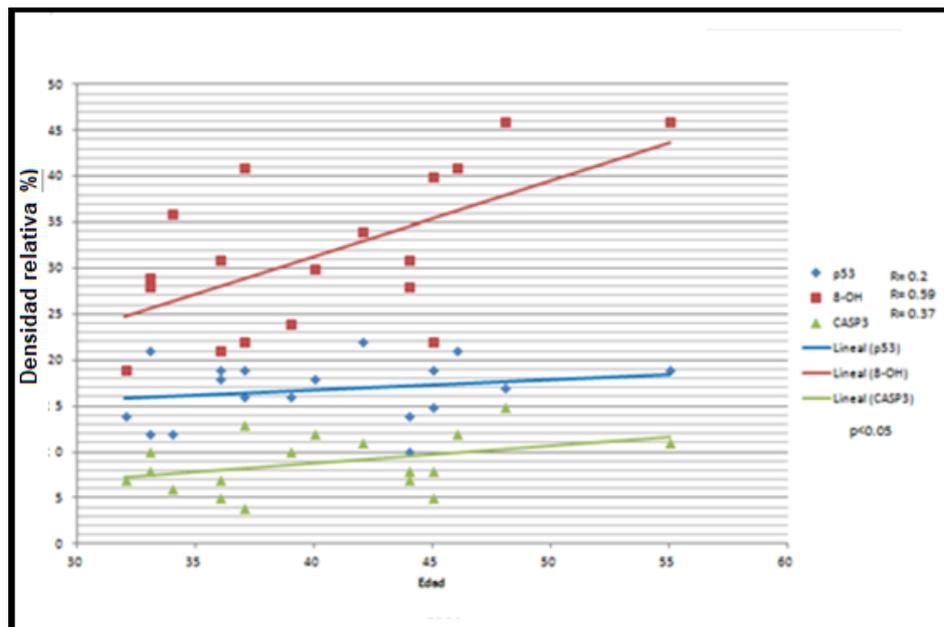
De igual manera se pudo observar que las muestras luego de gradiente presentan similar comportamiento (Figura 24).



**Figura 24.** Correlación de los marcadores, Anexina V, BODIPY y TUNEL con la variable edad en la fracción de muestra post gradiente (MG) (eje Y = porcentaje).

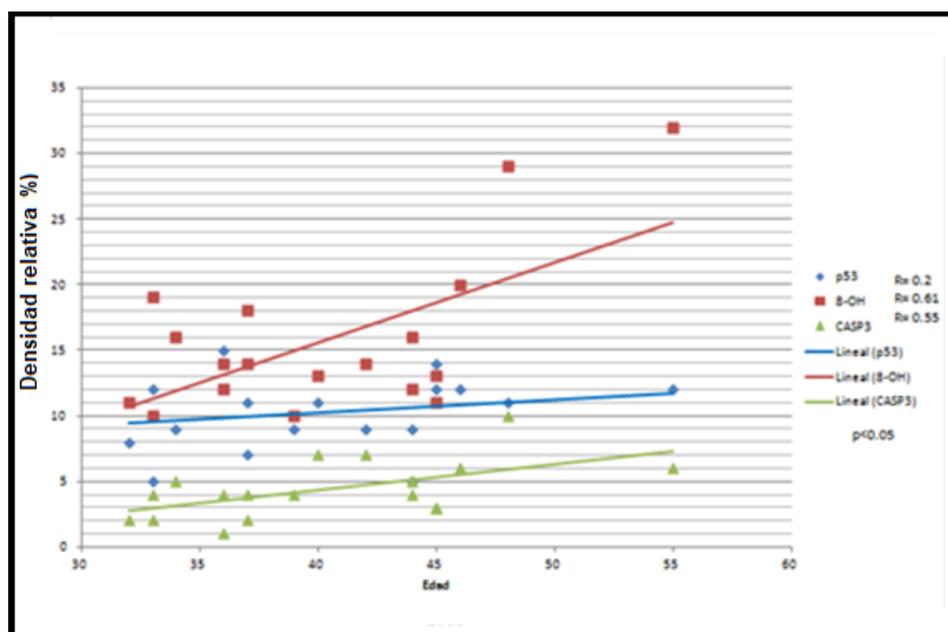
La correlación entre los marcadores y la variable edad es positiva y significativa en todos los casos post gradiente. Siendo la Anexina V el que presenta mayor valor de R ( $=0.35$ ), seguido por el BODIPY ( $R=0.31$ ) y finalmente el TUNEL ( $R=0.26$ ) (Figura 24).

Por otro lado, al realizar el mismo análisis de correlación entre los marcadores de p53, 8OHdG y Caspasa 3 activa vs. edad, morfología y movilidad, se observó que tanto en la ME, así como en la fracción MG, los tres marcadores expresaron una correlación positiva y significativa en relación a la edad del varón (Figuras 25 y 26).



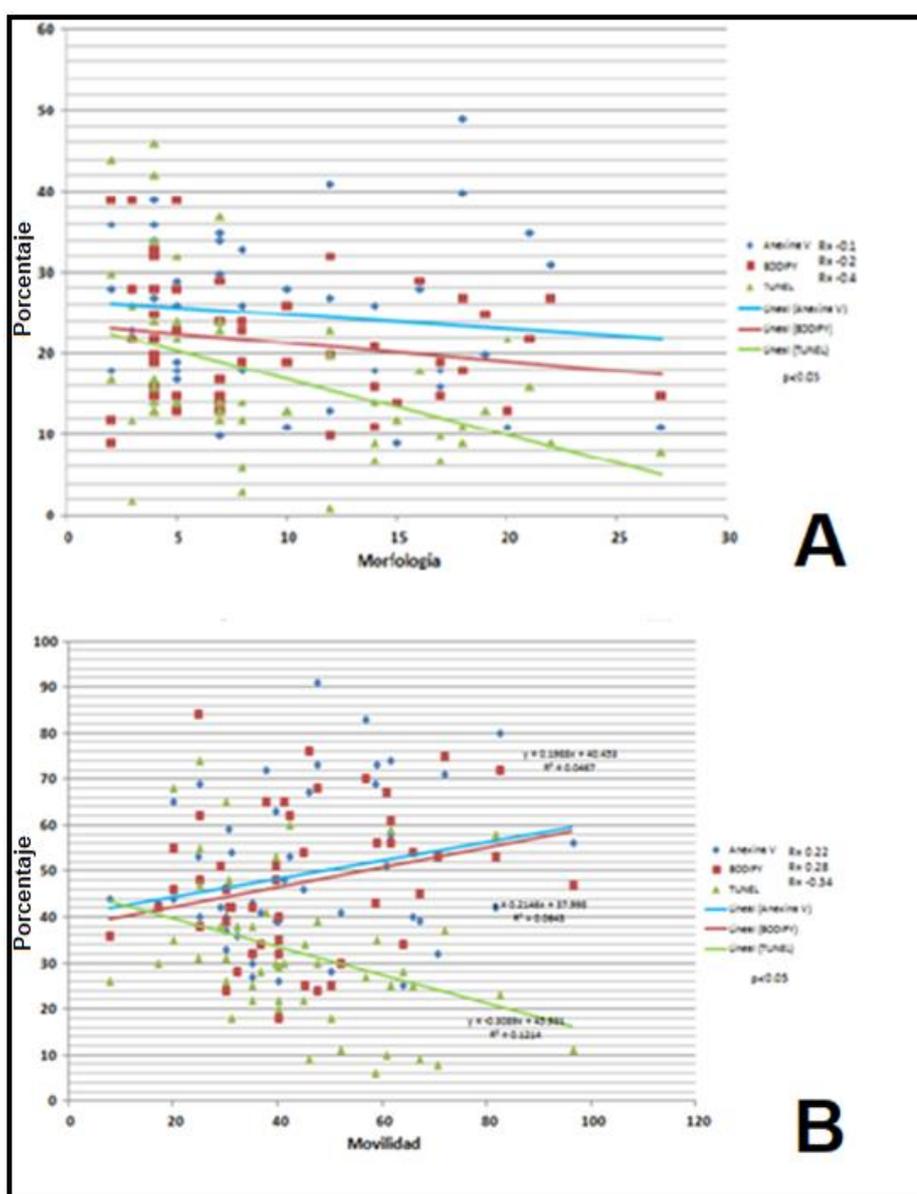
**Figura 25.** Correlación entre los marcadores p53, 8OH y Caspasa3 con la variable edad en la fracción de muestra entera (ME) (eje Y = densidad relativa).

La correlación entre los marcadores y la variable edad es positiva y significativa en todos los casos post gradiente. Siendo la 8OH-dG el que presenta mayor valor de R ( $=0.59$ ), seguido por la CC3 ( $R=0.37$ ) y finalmente el p53 ( $R=0.2$ ) (Figura 25).



**Figura 26.** Correlación entre los marcadores p53, 8OH y Caspasa3 con la variable edad en la fracción de muestra post gradiente (MG).

La correlación entre los marcadores y la variable edad es positiva y significativa en todos los casos post gradiente. Siendo la 8OH-dG el que presenta mayor valor de R ( $=0.61$ ), seguido por la CC3 ( $R=0.55$ ) y finalmente el p53 ( $R=0.2$ ) (Figura 26). A diferencia de lo mostrado anteriormente, al realizar el análisis de correlación de las mismas variables con respecto a la morfología en la muestra total, se observó que la correlación fue negativa y significativa en todos los casos (Figura 27A).

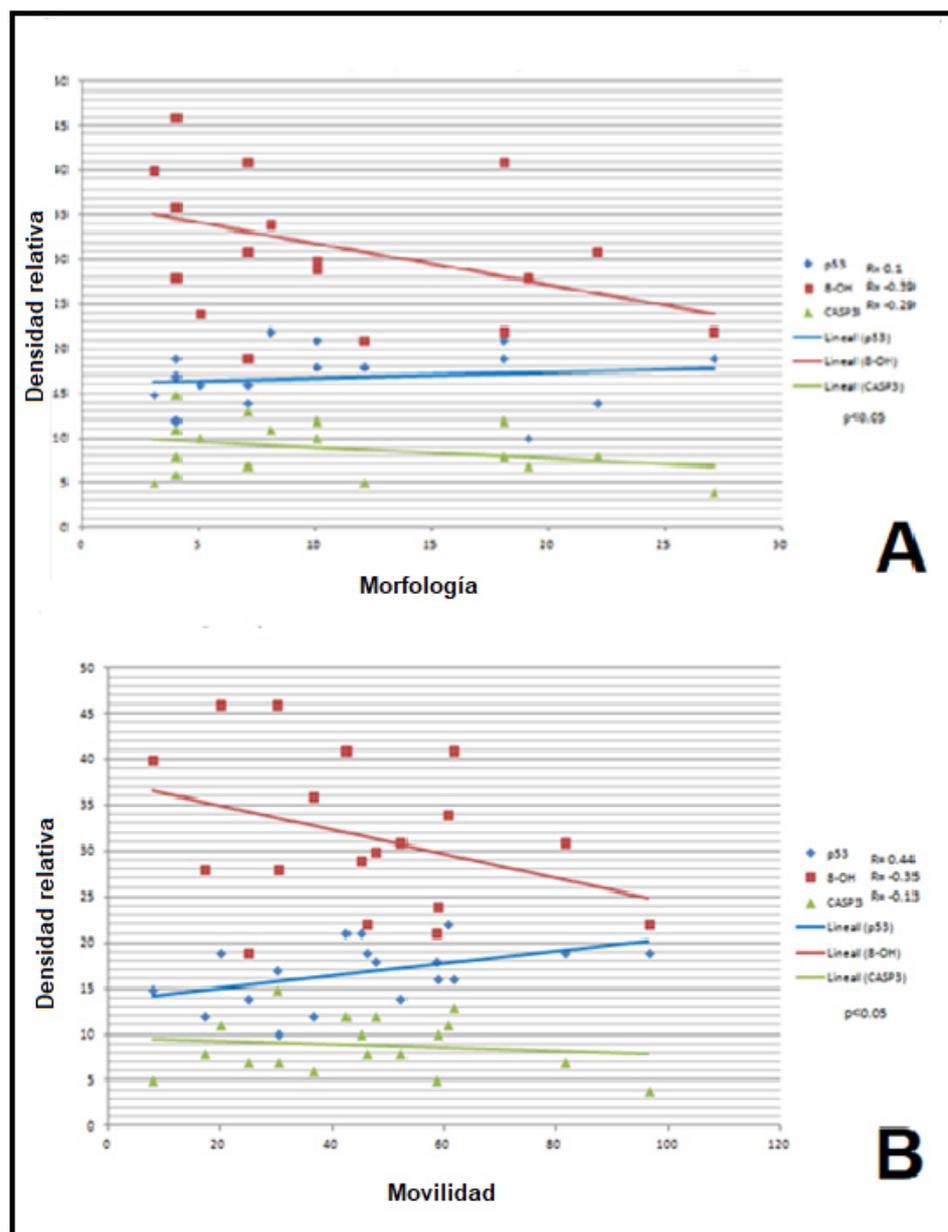


**Figura 27.** Correlación de los marcadores: Anexina V, BODIPY y TUNEL vs la morfología estricta (A) y la mov. (B).

La correlación entre los marcadores y la morfología es negativa y significativa en las muestras enteras. Siendo el TUNEL el que presenta mayor valor negativo de  $R$  ( $= -0.4$ ), seguido por el BODIPY ( $R = -0.2$ ) y finalmente la Anexina V ( $R = -0.1$ ) (Figura 27A).

En la figura 27B, se puede evidenciar la correlación entre las variables de TUNEL, BODIPY y Anexina V en relación a la movilidad, así, el TUNEL evidenció una correlación negativa y significativa ( $R = -0.34$ ), sin embargo, tanto el BODIPY como la Anexina V mostraron una correlación positiva y significativa con la movilidad,  $R = 0.22, 0.28$ , respectivamente).

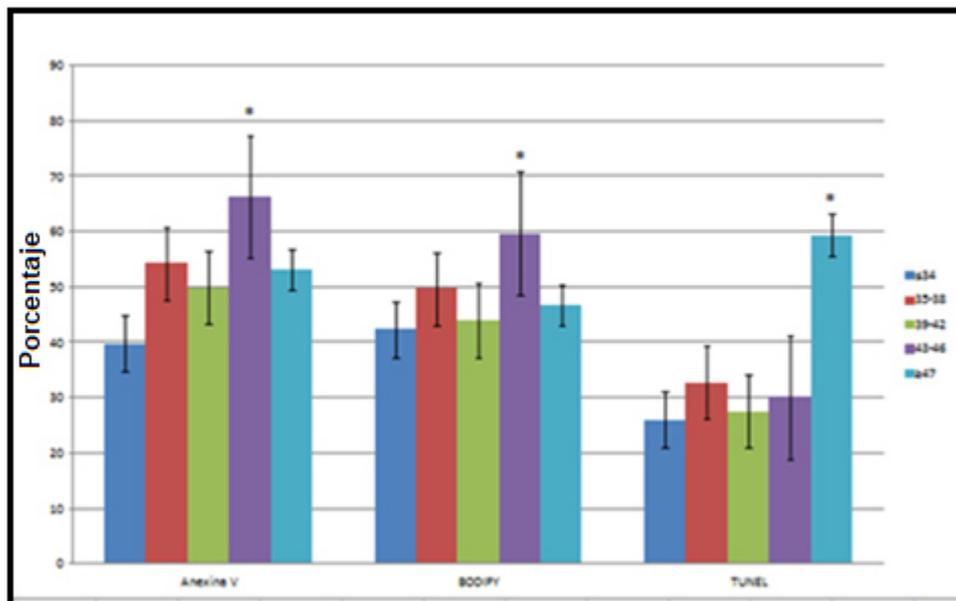
El análisis de correlación entre p53, 8OHdG y caspasa 3 activa vs. morfología mostró una correlación negativa y significativa (Figura 28 A). Ese mismo comportamiento se observó para 8OHdG y CC3 (Figura 28 B).



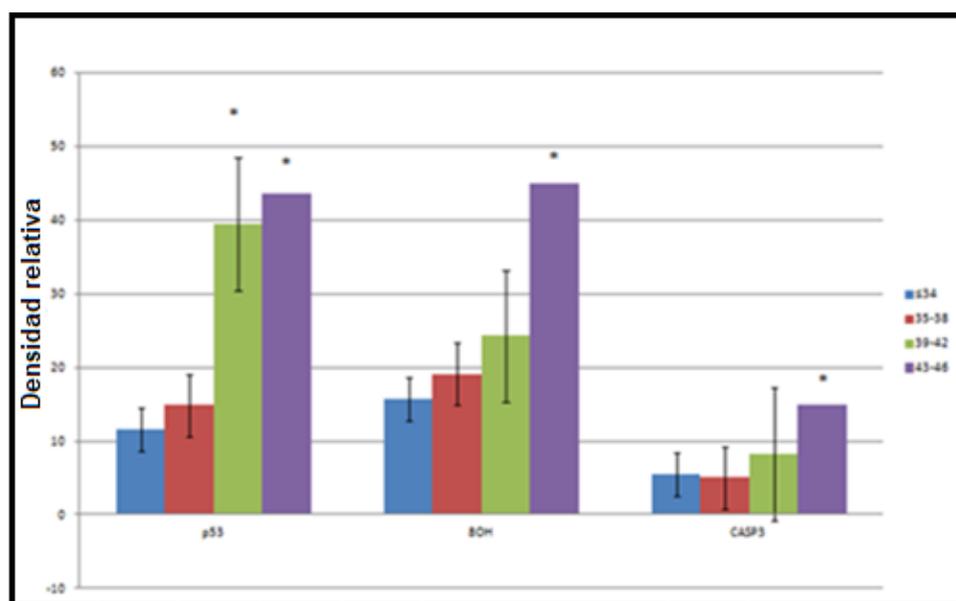
**Figura 28.** Correlación entre los marcadores p53, 8OHdG y CC3 vs. La morfología estricta de Kruger en la muestra entera (ME) (A) y la movilidad (B).

La correlación entre los marcadores y la morfología fue negativa y significativa en la muestra entera. Siendo la 8OHdG el que presentó un mayor valor de R ( $= -0.39$ ), seguido por la CC3 ( $R = -0.29$ ) y finalmente el p53 ( $R = -0.1$ ) (Figura 28A). La correlación entre los marcadores y la movilidad fue negativa y significativa en la muestra entera. Siendo la 8OHdG el que presenta mayor valor de R ( $= -0.35$ ), seguido por la CC3 ( $R = -0.13$ ), sin embargo, el p53 tuvo un comportamiento de correlación positiva ( $R = 0.44$ ) (Figura 28B).

Respecto a la edad, se evaluó a partir de qué edad se puede evidenciar un incremento de los marcadores en los pacientes estudiados. Así, en las figuras 29 y 30, podemos observar que a partir de los 45 años en adelante se observa un incremento significativo de los parámetros Anexina V, BODIPY y TUNEL (Figura 29). En la Figura 30 se muestra el mismo análisis con los valores de p53, 8OHdg y Caspasa 3 activa.



**Figura 29.** Porcentaje de Anexina, BODIPY y TUNEL en los grupos etarios definidos. (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 30.** Porcentaje de los marcadores p53, 8OHdG y CC3 en relación a los grupos etarios establecidos (\* $p < 0.05$ ).

En base a lo anteriormente mencionado (Figuras 29 y 30) y con el objetivo de afinar el análisis respecto al impacto de la edad del varón y su impacto sobre los parámetros seminales y las algunas de las variables estudiadas (Anexina V, Caspasa 3 activa, TUNEL y BODIPY), se estableció un valor de referencia para la edad (43 años). Así, al comparar estas variables en relación a este punto de referencia, se puede observar el siguiente resultado (Cuadro 13). En este cuadro se puede observar que existe un impacto positivo de la edad del varón por encima de los 43 años de edad, se evidenció un incremento significativo de las variables relacionadas al daño espermático (ruptura del ADN, oxidación y apoptosis), así como un impacto negativo sobre la movilidad espermática (cuadro 13).

**Cuadro 13. Comparación de las variables: Anexina V, CC3, TUNEL y BODIPY respecto a la edad (mayor o menor que 43 años).**

	<b>EDAD &lt; 43 años</b> <b>X±DS (IC95%)</b>	<b>EDAD ≥ 43 años</b> <b>X±DS (IC95%)</b>	<b>p</b>
<b>Concentración espermática (millones/mL)</b>	49,2 ± 19,4 (42,8-55,6)	47,2 ± 27,3 (35,1-59,3)	0,74
<b>Movilidad (a+b)</b>	37,1 ± 4,6 (35,5-38,6)	30,2 ± 4,7 (28,1-32,3)	0,001
<b>Morfología (%)</b>	7,5 ± 5,2 (5,8-9,2)	5,4 ± 4,3 (3,4-7,3)	0,1
<b>Anexina V (%)</b>	13,8 ± 8,6 (10,9-6,7)	25,0 ± 12,1 (19,7-30,3)	0,001
<b>Caspasa 3 activa (%)</b>	8,0 ± 4,2 (6,6-9,4)	13,2 ± 4,8 (11,1-15,5)	0,001
<b>TUNEL (%)</b>	14,8 ± 10,2 (11,4-18,1)	28,1 ± 13,4 (22,2-34,1)	0,001
<b>BODIPY (%)</b>	16,7 ± 8,5 (13,9-19,4)	26,5 ± 7,3 (23,3-29,8)	0,001

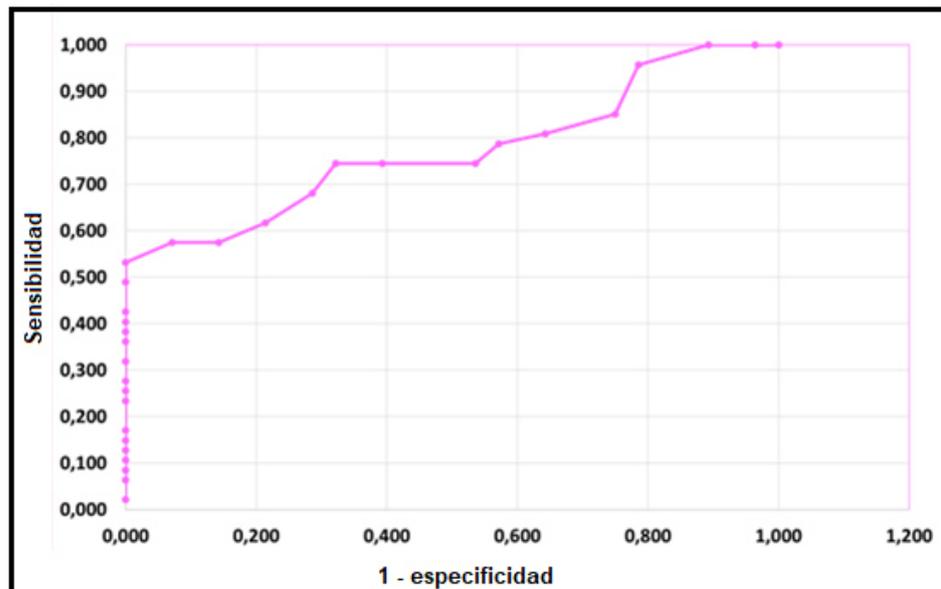
### 4.3 Resultados de los estudios de la infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático

Cuando se realizó el análisis espermático y de daño del ADN (TUNEL) entre las poblaciones de varones infértiles y fértiles, se evidenció una diferencia significativa entre los grupos para la variable morfología, movilidad progresiva y fragmentación del ADN (TUNEL) (Cuadro 14).

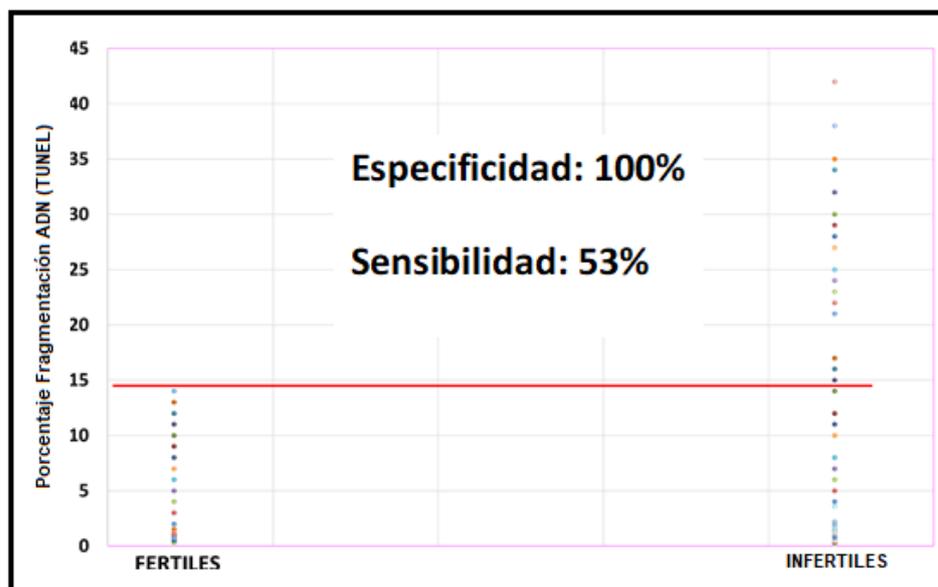
**Cuadro 14. Comparación de las variables seminales y la fragmentación del ADN respecto a la fertilidad.**

	<b>INFÉRTILES</b>	<b>FÉRTILES</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Edad</b>	36.5 ± 5.2	32.8 ± 4.7	0.99
<b>Concentración espermática (millones/mL)</b>	45.5 ± 40.6	55.1 ± 22.4	0.22
<b>Movilidad progresiva (%)</b>	47.8 ± 19.8	57.2 ± 16.1	<b>0.01</b>
<b>Morfología (%)</b>	6.5 ± 3.8	12.2 ± 2.5	<b>0.01</b>
<b>Fragmentación del ADN (%)</b>	17.8 ± 10.8	7.6 ± 3.9	<b>0.01</b>

Con ambas poblaciones, fértiles e infértiles, se realizó análisis de curva ROC para establecer un valor de corte para la fragmentación del ADN respecto al hecho de ser un varón fértil, así, se determinó que el valor de 15% de fragmentación del ADN espermático para determinar fertilidad, con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 53%. El área bajo la curva obtenida fue de 0,78 (Figura 31 y 32).



**Figura 31.** Gráfica de curva ROC para establecer el valor de corte de la fragmentación del ADN espermático entre poblaciones de varones fértiles e infértiles.



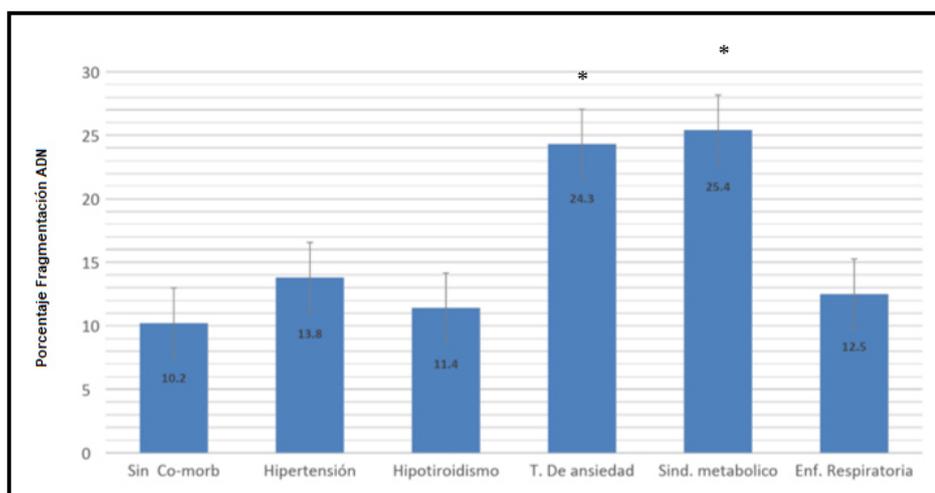
**Figura 32.** Gráfica de sensibilidad y especificidad de acuerdo al valor de corte de la fragmentación del ADN espermático (15%) entre poblaciones de varones fértiles e infértiles.

Luego de evaluar los antecedentes de la historia clínica de los varones infértiles y los análisis seminales de los mismos, se logró establecer una correlación positiva entre algunas comorbilidades medicas presentes con la fragmentación del ADN espermático. Así, las comorbilidades establecidas a partir de las historias clínicas fueron: hipertensión, hipotiroidismo, trastornos de ansiedad, síndrome metabólico y enfermedad respiratoria. En el cuadro 15, se puede observar la comparación entre varones infértiles con o sin comorbilidades médicas y su relación con los parámetros seminales y la fragmentación del ADN. Así en general, se pudo evidenciar que el volumen (mL), concentración espermática (millones/mL), movilidad progresiva (a+b) y la fragmentación del ADN (%) se vieron significativamente afectados ante la presencia de comorbilidades.

**Cuadro 15. Comparación de los parámetros seminales y fragmentación del ADN espermático entre pacientes infértiles con o sin comorbilidades (\*p<0,05)**

	Sin Co-morbilidades	Co-morbilidades
N° pacientes	1010	112
Edad	34,1 ± 9,6	35,6 ± 8,2
Volumen (mL)	3,5 ± 1,3	1,9 ± 0,5 (*)
Conc.	82,3 ± 34,3	53,2 ± 14,6 (*)
Movilidad III+II	55,8 ± 9,5	37,9 ± 11,4 (*)
Movilidad Total	61,8 ± 9,4	54,5 ± 11,1
Test eosina	70,1 ± 18,6	67,2 ± 14,4
PMN	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2
Morfología estricta (%)	8,4 ± 5,3	7,7 ± 4,7
Fragmentación ADN	10,2 ± 6,4	17,8 ± 5,3 (*)

Dentro los pacientes que presentaron comorbilidades, se comparó los niveles de fragmentación del ADN entre ellos, evidenciándose que los pacientes con trastornos de ansiedad y síndrome metabólico presentaron niveles significativamente mayores de daño del ADN (Figura 33). El síndrome metabólico fue definido por el médico en base a la historia clínica con evidencia de dislipemia secundaria (triglicéridos > 150 mg/dl, HDL < 40 mg/dl, colesterol total / HDL > 4,5), insulino resistencia (glucosa  $\geq$  100 mg/dl, insulina  $\geq$  126 mg/dl e IMC > 25 Kg/m<sup>2</sup>); en el caso de los pacientes con trastornos de ansiedad, este registro fue tomado de la historia clínica de los pacientes que reportaron derivación con psiquiatría/psicología, así también, con el consumo de medicamentos para el tratamiento del mismo; hipotiroidismo (TSH - tirotrópina > 5u/mL); hipertensión (presión arterial crónica > 140/90); enfermedad respiratoria crónica (antecedentes de asma, rinitis alérgica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica – EPOC).



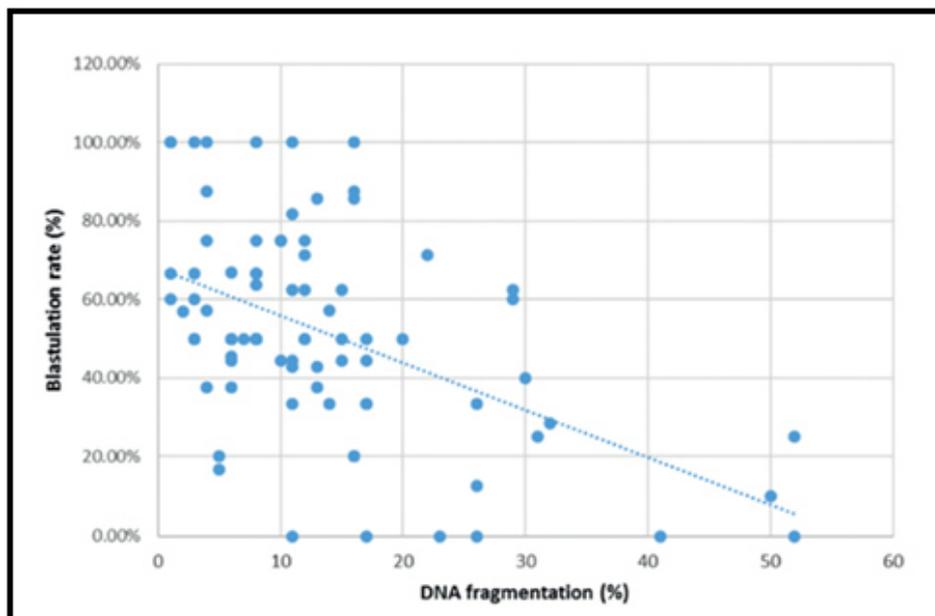
**Figura 33.** Comparación de los niveles de fragmentación del ADN espermático en una población de varones infértiles que presentaron comorbilidades médicas ( $p < 0,05$ ) (eje Y = porcentaje)

Luego de establecer el valor de corte de la fragmentación del ADN espermático en 15%, comparando varones fértiles e infértiles, se evaluó dentro de la población de varones infértiles aquellos que tenían valores por encima o por debajo de este valor y que realizaron tratamientos de reproducción asistida con óvulos donados. Así, se pudo evidenciar que la tasa de blastulación, es decir la probabilidad de formar un blastocisto (día quinto o sexto de desarrollo) fue significativamente menor en los pacientes que tenían un valor de TUNEL por encima de 15%, así mismo la tasa de embarazo fue menor en este grupo de pacientes (cuadro 16).

**Cuadro 16. Resultados clínicos dentro de una población de varones infértiles que realizaron tratamientos de reproducción asistida con óvulos donados.**

	<b>TUNEL &lt; 15%</b>	<b>TUNEL ≥ 15%</b>	<b>p</b>
<b>Numero de óvulos recibidos (X)</b>	8,9 ± 2,3	8,5 ± 1,8	0,75
<b>Morfología espermática (%)</b>	6,5 ± 3,1	5,9 ± 4,2	0,58
<b>Fragmentación del ADN espermático (%)</b>	7,6 ± 3,8	24,9 ± 11,5	0,001
<b>Tasa de fertilización (%)</b>	76,1 ± 19,4	73,8 ± 18,2	0,68
<b>Tasa de blastulación (%)</b>	59,2 ± 22	37,5 ± 28	0,008
<b>Tasa de embarazo (%)</b>	74,5	50	0,05

Al establecer el coeficiente de correlación entre la fragmentación del ADN y la blastulación, se observó que esta fue negativa y significativa ( $R = -0,50$ ) (Figura 34).



**Figura 34.** Análisis de correlación entre la fragmentación del ADN espermático y la tasa de blastulación,  $R = -0,5$ .

Finalmente, cuando se analizaron los embriones detenidos en su desarrollo de los pacientes infértiles que realizaron tratamientos de reproducción asistida con óvulos donados, se evidenció un incremento de daño en la evolución embrionaria, mediante mecanismos de apoptosis y daño directo del ADN de las blastómeras en aquellos pacientes con niveles de fragmentación de ADN mayor a 15% (Cuadro 17).

**Cuadro 17. Comparación de los niveles de daño del ADN y apoptosis en embriones detenidos provenientes de pacientes infértiles con valores de fragmentación del ADN mayor o menor a 15%.**

	<b>TUNEL &lt; 15%</b>	<b>TUNEL ≥ 15%</b>	<b>p</b>
<b>N.º de embriones</b>	112	75	
<b>N.º blastómeras</b>	860	432	
<b>Blastómeras sin daño del ADN (%)</b>	53,2	31,7	0,0001
<b>Blastómero con daño del ADN, CC3 (-) y Surv (-)</b>	9,1	15,9	0,0004
<b>Blastómero con daño del ADN, CC3 (+) y Surv (-)</b>	15,3	17,6	0,29
<b>Blastómero sin daño del ADN, CC3 (+) y Surv (+)</b>	2,9	3,9	0,45
<b>Blastómero con daño del ADN, CC3 (+) y Surv (+)</b>	16,4	21,9	0,007
<b>Blastómero con daño del ADN, CC3 (+) y Surv (+) y condensación nuclear</b>	3,0	8,8	0,0001

## **5. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES**

### **5.1 DISCUSIÓN**

El presente estudio abarcó el análisis de una población de varones que realizan tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad. Dentro de esta población la mayoría correspondían a casos de parejas que asisten al centro por factor masculino severo y también por casos de mujeres con baja reserva ovárica (cuadro 7, figura 16). Por otro lado, es importante resaltar que en la población estudiada prevalecieron de edades por encima de la media de varones que buscan fertilidad de forma natural, en esta población la edad promedio estuvo entre los 40 a 45 años de edad (cuadro 8, figura 17). Este dato es fundamental, ya que seguramente este aspecto relacionado a la edad podría estar relacionado con muchos otros aspectos tales como el estrés oxidativo, presencia de comorbilidades, etc., en este sentido, se ha podido confirmar en los resultados que la edad tuvo un impacto de manera significativa sobre la fragmentación del ADN por acción principalmente oxidativa (Cuadro 13, figuras 23-26, 29 y 30).

En este sentido, sobre el análisis de la fragmentación del ADN, es importante mencionar que desde el momento en que surgió, aportó nuevas expectativas en la búsqueda de explicación a las fallas repetidas de FIV-ICSI. Se ha descrito la importancia de la estabilidad del núcleo espermático en relación con el éxito reproductivo en humanos. Así, el incremento significativo de los niveles de fragmentación del ADN estaría asociado a bajas tasas de fertilización, implantación embrionaria e incremento de abortos (Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B, 2003; Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D., 2004; Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP, 2004; Lewis y Aitken, 2005; Messeguer et al, 2008; Aitken et al, 2009; Sakkas y Alvarez, 2010). En estos aspectos mencionados, este estudio ha podido confirmarlos, como se verá más adelante en la discusión. Cabe resaltar que tantos factores físicos como metabólicos pueden inducir el daño del ADN espermático. Este puede ocurrir en la espermatogénesis o durante el tránsito por el epidídimo (Aitken et al, 2005; Aitken et al, 2006; Aitken y DeLullis, 2007; Banks et al, 2005). De igual manera, se han descrito factores de riesgo asociados al incremento de la fragmentación del ADN, tales como: varicocele, criptorquidia, edad avanzada, leucocitospermia, teratozoospermia severa, episodios de fiebre alta, radio y quimio terapia (Angelopoulou R, Plastira K & Msaouel P, 2007; Delbes G, Hales BF & Robaire B, 2007; Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Morales I, Ríos R, Castro A, 2007; Smit M, van Casteren NJ, Wildhagen MF, Romijn JC, Dohle GR, 2010; Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG Jr, 2007;

Wu GJ, Chang FW, Lee SS, Cheng YY, Chen CH, Chen IC, 2009; Moskovtsev SI, Lecker I, Mullen JB, Jarvi K, Willis J, White J, Lo KC, 2009), todos estos eventos se encuentran directa o indirectamente asociados a la generación de especies reactivas del oxígeno, que como se mencionó anteriormente, sobrepasan la capacidad neutralizante en el tracto reproductivo, o del plasma seminal y debido a esto, tienen lugar eventos de oxidación en los espermatozoides. En este sentido, en el presente trabajo se evidenció claramente el incremento concomitante de los marcadores de daño de ADN junto a los de daño oxidativo, lo cual conduce a proponer que son eventos relacionados (cuadro 11 y 12, figura 20-22).

Con respecto a la búsqueda de diversos marcadores que se encuentran asociados al daño del ADN y estrés oxidativo (tanto en la membrana espermática como sobre el ADN mismo), se ha incluido la evaluación de lo que ocurre cuando se selecciona espermatozoides móviles mediante la técnica de gradiente en relación a los diversos marcadores. En todos los casos se logró realizar la técnica de separación con éxito, consiguiendo una tasa de movilidad óptima, siendo significativamente superior a la encontrada en la muestra total o entera, así mismo es importante resaltar que siempre que se realiza esta metodología de selección, se obtiene una menor cantidad de espermatozoides por mililitro.

En relación a los marcadores que permiten conocer mejor el origen del daño del ADN de estos varones, el uso del marcador BODIPY, ayuda a evaluar el daño peroxidativo en la membrana, con este ensayo se pudo

conocer si el daño del ADN podría haber estado inducido por estrés oxidativo. Por otro lado, la Anexina V y la CC3, son marcadores de membrana plasmática y de activación la vía apoptótica irreversible, respectivamente, los cuales permitieron asociar el daño producido en el ADN a eventos de apoptosis. Así mismo, el TUNEL es un marcador in situ para valorar el daño del ADN, tanto de simple como de doble cadena. Con lo expuesto, es importante conocer el origen del daño, ya que como se mencionó al inicio de este trabajo, sería de relevancia clínica, ya que podrían ayudar a dirigir de una mejor manera los tratamientos a realizar en estos varones, ya sean médicos (cirugías, tratamiento antioxidante) o mediante terapéuticas de eliminación (filtración) de estos espermatozoides dañados previo a su uso en las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (ICSI, inyección intracitoplasmática de espermatozoides).

Los resultados con la técnica de separación espermática por gradiente permitieron la disminución significativa de los marcadores relacionados al daño y oxidación del ADN, sin embargo, no existe una completa ausencia de los mismos, lo cual hace pensar que algunos espermatozoides móviles presentan daño del ADN y oxidación (cuadros 12 y 13, figuras 20-22). Este hecho es interesante, ya que como se sabe para las prácticas de FIV o ICSI, se utilizan estos espermatozoides móviles, por lo que aun realizando esta técnica habría la posibilidad de micro inyectar o inseminar espermatozoides dañados. Este hecho afectaría significativamente la disminución de los resultados reproductivos como la vamos a discutir más adelante.

Es importante mencionar que las técnicas propuestas (microscopía de fluorescencia y Western blot), para la evaluación de los marcadores, aunque no son las únicas disponibles, nos han permitido identificar de manera precisa y objetiva las variables propuestas. Así, en relación a la fluorescencia, la cuantificación mediante el conteo de un alto número de espermatozoides, permitió disminuir la desviación en los resultados. De igual forma, la técnica de Western blot, ha permitido objetivamente, mediante el análisis computarizado de la densidad de las bandas, establecer los valores relativos de cada uno de los marcadores (p53, 8OHdg y Caspasa 3 activa) (cuadro 12, figura 21).

Respecto al impacto de la edad y la fragmentación del ADN, algunas publicaciones de grupos de interés en el tema y como se ha demostrado en este trabajo, pone de manifiesto que los hombres con edad avanzada parecen producir espermatozoides con daño, por ejemplo, apoptosis, trastornos en la compactación de la cromatina, daño del ADN, mutaciones genéticas y/o aneuploidías (Aitken et al, 2009, Sakkas y Alvarez, 2010; Angelopoulou R, Lavranos G & Manolakou P., 2009). Algunos autores han reportado que el incremento de la fragmentación del ADN (TUNEL) puede estar vinculada a pacientes con edad avanzada. Sin embargo, sólo algunos de estos estudios encontraron alguna evidencia de un umbral en relación a la edad y el incremento significativo del daño del ADN, así la mayoría de estos reportes colocan la edad de 40-45 años como un criterio significativo para evaluar la fragmentación del ADN espermático (Angelopolou et al, 2007, Vagnini et al, 2007; Singh NP, Muller CH &

Berger RE. 2003; Colasante A, Minasi MG, Scarselli F, Casciani V, Zazzaro V, Ruberti A, Greco P, Varricchio MT, Greco E., 2019; Le MT, Nguyen TAT, Nguyen HTT, Nguyen TTT, Nguyen VT, Le DD, Nguyen VQH, Cao NT., 2019). En el presente trabajo, se evidenció de manera prospectiva que existe una correlación positiva y significativa entre la edad frente a la presencia de fragmentación del ADN, apoptosis y peroxidación lipídica en la membrana plasmática, tanto en la muestra total o entera como luego de ser procesada por gradiente (cuadro 13, figuras 29 y 30). Las correlaciones para los distintos marcadores al ser comparados entre la muestra total y post gradiente presentaron diferencias significativas (figuras 23-26). Es importante mencionar que en base a los últimos resultados propuestos en este estudio es clave pensar que los varones que realizan tratamientos de reproducción asistida, tendrían una mayor probabilidad de presentar este tipo de daño de forma significativa a partir de los 43 años. Lo cual podría ser una herramienta útil para seleccionar a pacientes que deberían realizar este tipo de estudio antes de iniciar cualquier tratamiento de alta complejidad.

Es interesante notar la correlación positiva, acentuada, entre el daño del ADN promovido por estrés oxidativo (8OHdG) y la edad de los varones (figuras 25 y 26). Lo cual estaría indicando que tanto, en muestra total como en el post gradiente, a medida que incrementa la edad, el origen del daño del ADN se originaría principalmente por el estrés oxidativo y, una proporción menor, por la vía de apoptosis directa (activación de caspasas o p53). Estos datos fueron confirmados por otros autores, mediante el

análisis de otras vías oxidativas clásicas, como la medición de malón di-aldeído (MDA), oxido-reducción, etc. (Agarwal A, Qiu E & Sharma R, 2018). Además, es crucial destacar que en este grupo de varones no presentaron ninguna patología testicular ni alteración del eje hipotálamo - hipófisis - gónada, por lo que sería principalmente la edad que por efecto oxidativo estaría promoviendo el daño del espermatozoide (a nivel del ADN, morfología y movilidad). A medida que aumenta la edad, se incrementa la posibilidad del daño oxidativo y por consiguiente podría afectar la fisiología testicular promoviendo la formación de espermatozoides dañados a raíz de las EROS (Aitken et al, 2009; Sakkas y Alvarez, 2010). Al respecto se han publicado numerosos trabajos que han descrito el efecto negativo del daño oxidativo (EROS) en relación a la integridad del espermatozoide, específicamente a nivel del ADN y como este evento impactaría en la fertilidad del varón (Aitken et al, 2006; Moustafa et al, 2004; Makker K, Agarwal A & Sharma R, 2009; Saleh y Agarwal, 2002, Aitken RJ, Baker MA & Sawyer D, 2003).

Por otro lado, en la literatura, la morfología espermática no siempre se ha asociado con el daño del ADN, existen reportes a favor de una asociación y otros que la contradicen (Zidi-Jrah I, Hajlaoui A, Mougou-Zerelli S, Kammoun M, Meniaoui I, Sallem A, Brahem S, Fekih M, Bibi M, Saad A, Ibalá-Romdhane S., 2016; Colasante et al., 2016). Sin embargo, en base a los resultados obtenidos, sobre la muestra entera, se pudo observar que los marcadores de daño del ADN (TUNEL), Anexina V (apoptosis) y BODIPY (peroxidación lipídica) correlacionaron negativamente con el

incremento del índice de morfología espermática (figuras 27A y 28A). Es decir, que las muestras con una mayor proporción de espermatozoides normales, presentaron bajos niveles de fragmentación de ADN, apoptosis y estrés oxidativo. Es interesante poder plantear la hipótesis que, al existir un incremento del daño espermático, esto repercute en la morfología del mismo, imaginando que esto ocurre principalmente a nivel testicular, específicamente durante la espermiogénesis, que como se mencionó en la introducción, es la etapa más susceptible a una serie de eventos que puedan causar algún tipo de daño en los espermatozoides maduros. Se ha establecido previamente que la asociación entre la morfología espermática inadecuada y la fragmentación del ADN espermático están relacionadas con la probabilidad de abortos tempranos en la población de pacientes con abortos recurrentes (Zidi-Jrah I et al., 2016).

En relación a la movilidad espermática ocurrió un fenómeno también interesante, se pudo observar que la movilidad presenta una correlación negativa con la fragmentación del ADN, Anexina V y BODIPY (figuras 27B y 28B). Esto sugiere que, en la muestra total, la fragmentación de ADN estaría más asociada a espermatozoides inmóviles, por lo que las muestras con menor movilidad presentan mayor índice de daño del ADN y muerte celular. Por otro lado, la Anexina V y el BODIPY, son marcadores de superficie espermática, están altamente relacionados al daño de la membrana, lo cual impacta negativamente la movilidad espermática (cuadros 13 y 14). Así la movilidad espermática evidenció una correlación negativa con el incremento de daño del ADN por estrés oxidativo,

confirmado por el incremento de los niveles de TUNEL y 8OHdG. La Caspasa 3 activa también evidenció una correlación en relación a la movilidad espermática, esto probablemente está relacionado con la activación de la Caspasa 3 y la disfunción mitocondrial, lo cual es íntimamente relacionada a la reducción de la motilidad espermática (Sakkas y Alvarez, 2010, Aitken RJ, Baker M & Nixon B, 2015).

Por otro lado, tomando los eventos de daño del ADN espermático relacionados a las comorbilidades médicas, fue muy interesante encontrar un incremento significativo del daño del ADN en pacientes con trastornos metabólicos y aquellos que consumen medicamentos para el tratamiento de la ansiedad (cuadro 15, figura 33). En relación a esto existe evidencia del impacto del síndrome metabólico asociado al sobrepeso y la obesidad sobre la generación de estrés oxidativo sobre muchas células de órganos con alto gasto energético, incluido el testículo (Włodarczyk M & Nowicka G, 2019; Aitken et al., 2011; McPherson N & Lane M, 2015). Si bien, no fue un objetivo dar respuesta a esta situación con demasiada precisión, es importante comentar que se ha publicado que, durante el síndrome metabólico asociado a obesidad, se producen señales pro-inflamatorias constantes, lo cual promueve el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos que, a su vez, crean especies reactivas del oxígeno y nitrógeno endógenas (Włodarczyk M & Nowicka G, 2019). Respecto al consumo de ansiolíticos no hay reportes publicados en la literatura al respecto, sin embargo, esto abre una puerta para estudios posteriores ya que actualmente es cada vez más frecuente el consumo de este tipo de medicación y en muchos de los

casos sin prescripción médica. Es importante resaltar esta etapa del trabajo de investigación por el interés social, en el sentido que cada vez es más frecuente encontrar personas sedentarias, con síndrome metabólico asociado en la mayoría de casos a diabetes tipo II, lo cual debe ser un disparador de alerta al momento de la consulta por infertilidad.

Un hallazgo importante en este trabajo es la asociación del daño del espermatozoide (principalmente daño del ADN) con el daño oxidativo. Sin embargo, es relevante un aspecto fundamental el establecer el valor de corte relacionado a la capacidad fértil de un varón. Es decir, al comparar una población de varones fértiles e infértiles, se determinó que el valor de corte de 15% permitió diferenciar la capacidad reproductiva de estas dos poblaciones (cuadro 14, figuras 31 y 32). En la literatura, existen numerosos valores de corte para el daño del ADN, estos sufren modificaciones considerando principalmente el método de detección, en el caso del TUNEL, el valor de corte previamente establecido por la literatura fue del 20% (Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G., 2005), en este trabajo se estableció el valor de corte utilizando la muestra entera (móviles + inmóviles), y el TUNEL fue cuantificado por citometría de flujo. Así mismo, Sharma y colaboradores establecieron un valor de corte en 19.75%, en este caso fue realizado en la muestra entera y cuantificada por microscopía de fluorescencia. Sin embargo, es preciso recalcar la importancia de que cada laboratorio logre establecer su propio valor de corte, y que éste se encuentre correctamente validado entre las poblaciones incluidas. En este sentido, en la población de varones

infértiles, se incluyeron sólo pacientes con factor masculino, es decir que la pareja no presentara ningún indicio de infertilidad, esto fue fundamental al momento de medir el impacto sólo del factor masculino puro. Así mismo, en el caso de los varones fértiles, se incluyeron a hombres que habían logrado el embarazo y nacimiento de un niño en un periodo no mayor a 6 meses en relación al momento de la evaluación de su muestra seminal para este estudio. Actualmente, en la región de Sudamérica, no existen reportes publicados de valores de corte para este marcador espermático, para la técnica de TUNEL por microscopía de fluorescencia. A raíz de este estudio, el valor de corte del 15% ha sido considerado como referencia para muchos laboratorios clínicos. Luego de establecer este valor de corte, clínicamente se ha podido demostrar que varones que tienen niveles por encima de 15% sufren un impacto negativo sobre los resultados reproductivos.

La calidad seminal generalmente se expresa en términos de la concentración, motilidad y morfología espermática (OMS, 2010). Previamente se ha publicado que estos parámetros, específicamente la morfología y la motilidad, se encuentran estrechamente relacionadas a las alteraciones del ADN (Uriondo H, Alvarez Sedó C, Gil MV, Frazer P, Serna J, Nodar F., 2011, Alvarez Sedó et al., 2012). Aunque el daño al ADN espermático no se considera dentro del análisis regular del semen, la literatura sugiere que el daño en el ADN espermático produce un impacto relevante en la fertilidad masculina. Se han presentado varias teorías para explicar el daño en el ADN espermático (apoptosis, remodelación de la

cromatina, daño oxidativo) (Sakkas y Alvarez, 2010). Durante el proceso de la selección natural de las especies, la fecundación debe ocurrir idealmente gracias a la participación de un ovocito de buena calidad y un espermatozoide con el ADN integro. A la fecha, las técnicas de reproducción asistida han mejorado sustancialmente en la selección espermática, sin embargo, no se puede garantizar el uso de espermatozoides sanos (sin ADN dañado) para fecundar al ovocito (Tavukçuoğlu et al., 2012). Con el objetivo de caracterizar a la calidad espermática, la fragmentación del ADN espermático se puede considerar como un parámetro importante de la calidad del semen y sirve de manera específica para evaluar la integridad nuclear, que como mencionamos anteriormente juega un rol fundamental en los procesos de fecundación y desarrollo embrionario (Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A., 2007).

El papel fundamental del espermatozoide en la definición de la infertilidad masculina ha tenido por muchos años un real interés, sin embargo, poco se sabe en detalle con el nivel de acción específico que tienen determinadas afectaciones espermático sobre diferentes eventos reproductivos, así, por ejemplo, desde la introducción del ICSI ha llamado la atención sobre el impacto en el desarrollo embrionario in vitro. Sabemos que el ICSI fue introducido como opción de tratamiento para pacientes con muy pobres características del semen, principalmente la de movilidad y concentración. Lo que he demostrado en el trabajo, es que el daño del ADN estaría relacionado a la mala morfología y movilidad. Además, el presente estudio

también evidenció que las tasas de blastulación fueron menores cuando existieron altos niveles de daño en el ADN espermático (figura 34), lo que sugiere un inicio muy temprano de los efectos espermáticos sobre el desarrollo embrionario, es decir, antes de la implantación. En el presente estudio, se evaluó el daño del ADN espermático, por el ensayo TUNEL, en la misma muestra de espermatozoides móviles que luego fueron utilizados para ICSI. Se demostró una capacidad predictiva de la prueba de integridad del ADN espermático, realizada en muestra entera vs. la muestra post-gradiente, así se ha observado una disminución significativa cuando los espermatozoides se prepararon usando técnicas de gradiente de densidad por centrifugación, cabe resaltar que esto se logró sin importar el valor de la fragmentación inicial, es decir, aun con niveles altos de fragmentación del ADN en la muestra entera, la realización de gradientes de densidad permitió disminuirlo de manera significativa (Rougier N, Uriondo H, Papier S, Checa MA, Sueldo C, Alvarez Sedó C., 2013, Alvarez Sedó C, Barros MA, Boudri HU, Rougier N, Papier S, Nodar F, 2013). Sin embargo, en la población estudiada, varias muestras tuvieron altos niveles de fragmentación del ADN ( $> 15\%$ ) incluso después del aislamiento de espermatozoides móviles. En este sentido, estos son los pacientes que generan un grupo de interés ya que la técnica de separación espermática no es suficiente para disminuir los niveles de daño por debajo de valor umbral, esperando en estos casos peores resultados reproductivos.

Los datos mostrados no evidenciaron una relación entre daño del ADN espermático y tasas de fertilización en ICSI, pero la tasa de blastulación

disminuyó claramente cuando el daño al ADN fue alto (cuadro 16). En este sentido, debe mencionarse que durante el proceso de falla de fecundación luego de ICSI relacionado a la fragmentación del ADN, ésta no se encuentra dentro las principales causas (Alvarez Sedó et al., 2013). En este estudio se demostró que el nivel elevado de fragmentación del ADN causante de la falla de fecundación fue sólo en el 20% de los casos, esto quiere decir que no tiene un impacto elevado durante este proceso (fecundación), sin embargo, es la falta de descondesación del ADN espermático (35%) el principal evento encontrado en la falla de fecundación luego de ICSI en casos de factor masculino. Los pacientes con bajos niveles de fragmentación de ADN (<15%) presentaron una clara tendencia a alcanzar mayores tasas de embarazo (cuadro 16). Estos resultados pueden explicarse por el hecho que los altos niveles de fragmentación del ADN probablemente no impidan fertilización, pero previene la blastulación y/o el exitoso desarrollo embrionario (Ahmadi A & Ng C, 1999). Sin embargo, este problema se observó principalmente en pacientes que realizaron ICSI (como fue en realizado en este trabajo), por el contrario, cuando se analizaron casos por FIV convencional, estas diferencias no fueron evidentes, probablemente debido a la selección "natural" de espermatozoides por el ovocito (Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G, 2006). La cantidad de daño del ADN espermático está relacionado con el desarrollo del embrión a la etapa de blastocisto, cuando el genoma embrionario se activa (transición de día 2 a 3 del desarrollo) inicia la transcripción de genes espermáticos, por lo que el genoma paterno juega un papel significativo en la función

embrionaria hacia la implantación (Seli et al., 2004).

Esta tesis incluye el primer reporte que utilizó un modelo de donación de óvulos para evaluar el impacto del daño del ADN sobre los resultados clínicos y biológicos. Los resultados biológicos evidenciaron que el daño del ADN espermático podría promover la fragmentación directa del ADN de las blastómeras sin la activación de la maquinaria apoptótica, probablemente debido a la inyección del espermatozoide con un ligero daño en el ADN que pudo incrementarse durante el desarrollo embrionario (cuadro 17). Sin embargo, otros mecanismos podrían estar en juego en la detención del desarrollo embrionario. Así, la mayoría de los blastómeros mostraron un patrón apoptótico completo (TUNEL (+), CC3 (+) y Surv (+), revelando que los ovocitos de buena calidad responden adecuadamente a la inducción de la apoptosis por el espermatozoide. Sin embargo, esto se observó principalmente en embriones que provenían de muestras con altos niveles de daño en el ADN, confirmando que el daño de los espermatozoides puede causar mayor detención en el desarrollo embrionario.

Finalmente, los datos indicaron que la fragmentación del ADN espermático afectó significativamente la blastulación e implantación en pacientes (ICSI) que recibieron óvulos donados. Más específicamente, este estudio ha mostrado, por primera vez, que la fragmentación del ADN espermático podría comprometer la progresión del desarrollo embrionario, lo que resulta en embriones detenidos. Este estudio también destacó el

importante valor predictivo del análisis de la fragmentación de ADN espermático en comparación a solamente la valoración de los parámetros seminales tradicionales en la evaluación de resultados de TRA. Por esta razón, el estudio de fragmentación del ADN espermático debe considerarse durante la evaluación de la calidad del semen.

## 5.2 CONCLUSIONES

- 1) Existe una correlación negativa entre la fertilidad masculina y el incremento del daño del ADN espermático.
- 2) El daño del ADN espermático está asociado a los mecanismos de daño oxidativo en mayor medida y apoptosis en menor medida.
- 3) El incremento de la edad del varón se asocia positivamente con el incremento del daño del ADN, y esto es principalmente mediado por procesos oxidativos.
- 4) La disminución en la movilidad espermática y la morfología se asocian a mayores tasas de daño en el ADN espermático, estos eventos estarían relacionados al daño oxidativo principalmente.
- 5) Se ha establecido un valor de corte para el daño del ADN del 15%. Cuando los pacientes presentan valores por encima de este punto, se puede observar una menor calidad espermática, menor calidad embrionaria y menores tasas de embarazo.
- 6) Cuando una muestra de espermatozoides con altos niveles de daño del ADN es utilizada para fecundar un óvulo, esto puede repercutir principalmente en la activación de vías de la apoptosis y promover la detención embrionaria.
- 7) Los valores de daño de ADN, apoptosis y estrés oxidativo disminuyen significativamente con la aplicación de la técnica de “gradiente de centrifugación” para la separación espermática.
- 8) Por todo lo expuesto, se debería incluir el estudio del daño del ADN como un criterio en la evaluación de la calidad seminal y potencialidad de fertilidad del varón.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal A, Majzoub A, Esteves S, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol.* 2016; 5(6): 935–950.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte N. A unique view on male infertility around the globe *Reprod Biol Endocrinol.* 2015; 13: 37.
- Agarwal A, Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Larson K. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stage of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod.* 2001; 16, 1912-21.
- Agarwal A, Qiu E, Sharma R. Laboratory assessment of oxidative stress in semen. *Arab J Urol.* 2018 Mar; 16(1): 77–86.
- Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 2014; 32:1–17.
- Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 1999; 284:696-704.
- Aitken J. DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring. *Transl Androl Urol.* 2017 Sep; 6(Suppl 4): S761–S764
- Aitken JR, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iullis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andorl.* 2014; 16:31-38.

- Aitken RJ and Baker HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Human Reprod* 1995; 10, 1736–1739.
- Aitken RJ and Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa, the balance of benefit and risk. *Bioessays* 1994; 16, 259–268.
- Aitken RJ, Baker M, Nixon B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl.* 2015; 17(4): 633–639.
- Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7(1):65-70.
- Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, Wiklendt AM, King BV. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl.* 2005; 28(3):171-9.
- Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K and Richardson DW. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients. *J Reprod Fertil* 1992; 94, 451–462.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW and Irvine DS. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Human Reprod* 1995; 10, 2061–2071.
- Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl.* 2009; 32: 46–56.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 727–733.
- Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, Koppers AJ, McLaughlin EA. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(10):4154-63.

- Alvarez JG and Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev* 1995; 42:334-346.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L and Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl* 1987; 8, 338–348.
- Alvarez Sedó C, Barros MA, Boudri HU, Rougier N, Papier S, Nodar F. Changes in DNA fragmentation during sperm preparation for ICSI over time. *JBRA Assist Reprod.* 2013;17:109-14.
- Alvarez Sedó C, Noblia F, Franco MC, Nodar F, Fiszbajn G, Papier S. Oocyte and sperm factors implicated in fertilization failure after ICSI. *Fertil Steril* 2013; 100; 3: S94.
- Alvarez Sedó C, Uriondo Boudri H, Serna J, Nodar F, Papier S, Chillik C. La edad masculina y su relación con los niveles de apoptosis y peroxidación lipídica en espermatozoides de varones que realizan tratamientos de TRA. *Reproducción* 2012; 27:71-78.
- Angelopoulou R, Lavranos G, Manolakou P. ROS in the aging male: model diseases with ROS-related pathophysiology. *Reprod Toxicol.* 2009; 28(2):167-71.
- Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007 30; 5:36.
- Aoki VW, Moskovtsec SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl.* 2005; 26:741-8
- Balasuriya A, Serhal P, Doshi A, Harper JC. Processes involved in assisted reproduction technologies significantly increase sperm DNA fragmentation and phosphatidylserine translocation. *Andrologia.* 2014;46(2):86-9
- Balhorn R. Sperm chromatin: and overview. Cap1: 3-17. Zini A, Agarwal A (eds.), *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Application in Male Infertility and Assisted Reproduction.* 2011.

- Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005; 129, 505-14.
- Barratt C, Björndahl L, De Jonge C, Lamb D, Osorio Martini F, McLachlan R, Oates, van der Poel S, St John B, Sigman M, Sokol R, Tournaye H. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update* 2017; 23(6): 660-680.
- Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993; 49, 1083–8.
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* 2006; 21:2876-81.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 2004; 19:1401-8.
- Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di BD, De PA. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligoasthenoteratozoospermia have an increased aneuploidyrate. *Hum Reprod* 2004; 19, 2298–302.
- Carrell DT , Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl .* 2003; 49 (1): 49-55.
- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Updates* 2007; 13:22-27
- Casanovas A, Ribas-Maynou J, Lara-Cerrillo S, Jimenez-Macedo AR, Hortal O, Benet J, Carrera J, García-Peiró A. Double-stranded sperm

- DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertil Steril*. 2019 Apr;111(4):699-707.
- Castillo J, Estanyol JM, Ballescá JL, Oliva R. Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl*. 2015;17(4):601-9
  - Cho CL, Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: concise practice recommendations. *Transl Androl Urol*. 2017 Sep;6(Suppl 4): S366-S373.
  - Cho CL, Agarwal A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab J Urol*. 2017; 16(1):21-34
  - Colasante A1, Minasi MG, Scarselli F, Casciani V, Zazzaro V, Ruberti A, Greco P, Varricchio MT, Greco E. The aging male: Relationship between male age, sperm quality and sperm DNA damage in an unselected population of 3124 men attending the fertility centre for the first time. *Arch Ital Urol Androl*. 2019 18;90(4):254-259.
  - Comhaire, F. H. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. 2010. P. J. Rowe (Ed.). Cambridge University Press.
  - Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR: Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res* 1975, 90(2):411-428.
  - De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(6):727-33.
  - de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995; 1:15-21.
  - Delbes G, Hales BF, Robaire B. Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *J Androl*. 2007; 28(2):241-9.
  - Dominguez K, Arca CDR, Ward WS. The relationship between chromatin structure and DNA damage in mammalian spermatozoa. pp: 61-68. In Zini A & Agarwal A., *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Application in Male Infertility and Assisted Reproduction*. Springer NY, 2011.

- Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A, Aitken RJ, Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*. 2017 Dec;49(10).
- Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrda E. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32(4):509-20.
- Duru NK, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoia. *Fertil Steril*. 2000; 74, 1200-1207.
- Esteves SC, Santi D, Simoni M. An Update on Clinical and Surgical Interventions to Reduce Sperm DNA Fragmentation in Infertile Men. *Andrology*. 2019: En prensa.
- Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM: Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reproductive toxicology* 1991, 5(2):115-125.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP: Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human reproduction* 1999, 14(4):1039-1049.
- Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C: Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and sterility* 2005, 84(4):833-842.
- Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG: The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003, 24(1):59-66.
- Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1991; 88:11003-11006.

- Fütterer JJ, Heijmink SW, Spermon JR. Imaging the Male Reproductive Tract: Current Trends and Future Directions. *Radiol Clin North Am.* 2008; 46(1):133-47.
- García-Rodríguez A, Gosálvez J, Agarwal A, Roy R, Johnston S. DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells. *Int J Mol Sci.* 2018; 20(1).
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 1992, 119(3):493-501.
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005; 20, 226–30.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1995; 103(1): 17-26.
- Guttmacher AF. Factors affecting normal expectancy of conception. *J Am Med Assoc.* 1956; 161 (9): 855-60.
- Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J Roy Soc Med.* 1984; 82:747–752.
- Herrero MB and Gagnon C. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *J Androl* 2001; 22, 349–356.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W: A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Molecular human reproduction* 1996, 2(8):613-619.
- Izzo A, Kamieniarz K, Schneider R. The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biol Chem.* 2008;389(4):333-43.
- Jager S. Sperm nuclear stability and male infertility. *Arch Androl* 1990; 25, 253–259.
- Janssen YM, Van-Houton B, Borm PJ, Mossuran BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993; 69, 261–274.
- Jones R, Mann T and Sherins RJ. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid

- peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979; 31, 531–537.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*. 1997; 65, 519–524.
  - Kowalski A, Palyga J. Linker histone subtypes and their allelic variants. *Cell Biol Int*. 2012; 36(11): 981-96.
  - Krausz C. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011, 26: 271–285.
  - Kumar K, Lewis S, Vinci S, Riera-Escamilla A, Fino MG, Tamburrino L, Muratori M, Larsen P, Krausz C. Evaluation of sperm DNA quality in men presenting with testicular cancer and lymphoma using alkaline and neutral Comet assays. *Andrology*. 2018; 6(1):230-235.
  - Kumar R. Male infertility- Current concepts. *Indian Journal of Urology: IJU: Journal of the Urological Society of India*. 2011;27(1):39-40
  - Le MT, Nguyen TAT, Nguyen HTT, Nguyen TTT, Nguyen VT, Le DD, Nguyen VQH, Cao NT. Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters? *Reprod Med Biol*. 2019; 18(4):390-396.
  - Lewis SE, John Aitken R, Conner SJ, Iuliis GD, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P: The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive biomedicine online* 2013, 27(4):325-337.
  - Lewis SE1, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*. 2005; 22(1):33-41.
  - Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res*. 2009; 129(4):357-67.
  - Martins AD, Majzoub A, Agawal A. Metabolic Syndrome and Male Fertility. *World J Mens Health*. 2019; 2:113-127
  - Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine* 2008; 14:1197-1213.
  - McPherson N, Lane M. Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? *Asian J Androl*. 2015; 17(3): 450–458.

- McPherson S and Longo FJ. Chromatin structure–function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993; 37, 109-28.
- Meistrich ML, Bucci LR, Trostle-Weige PK, Brock WA. Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Developmental Biology* 1985; 112(1):230-40.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 2003; 111:483-488.
- Messeguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE. 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: 1191–1199.
- Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002; 25, 255–61.
- Moskovtsev SI, Lecker I, Mullen JB, Jarvi K, Willis J, White J, Lo KC. Cause-specific treatment in patients with high sperm DNA damage resulted in significant DNA improvement. *Syst Biol Reprod Med*. 2009; 55(2):109-15.
- Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*. 2004; 19(1):129-38.
- O'Brien KLOF, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil Steril*. 2010; 93(1):1-12.
- O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 2008; 23:1044–3.
- Ostling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1984, 123(1):291-298.
- Paul C, Murray AA, Spears N, Saunders PT. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*. 2008;136(1):73-84.

- Poongothai J, Gopenath T S, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 2009; 50(4): 336
- Quallich S. Examining Male Infertility. *Urol Nurs.* 2006;26(4):277-88
- Ribeiro S, Sharma R, Gupta S, Cakar Z, De Geyter C, Agarwal A. Inter- and intra-laboratory standardization of TUNEL assay for assessment of sperm DNA fragmentation. *Andrology.* 2017; 5(3):477-485.
- Rogenhofer N, Dansranjavin T, Schorsch M, Spiess A, Wang H, von Schönfeldt V, Cappallo-Obermann H, Baukloh V, Yang H, Paradowska A, Chen B, Thaler CJ, Weidner W, Schuppe HC, Steger K. The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Hum Reprod.* 2013; 28(4):969-78
- Rougier N, Uriondo H, Papier S, Checa MA, Sueldo C, Alvarez Sedó C. Changes in DNA fragmentation during sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection over time. *Fertil Steril.* 2013;100:69-77
- Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C. Selection of non-apoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2005; 74(3), 530-7.
- Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997; 18, 294–301.
- Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010; 93(4):1027-36.
- Sakkas D, Cayli S, Vigue L, Demir R, Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: cyclin kinase, caspase-3, and BCL-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol. Hum. Reprod* 2004; 10, 365-72.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizarro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1998; 4, 37-7.

- Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y and Campana A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reprod* 1998; 13, 11–19.
- Sakkas, D, El-Domayti M, Al-Din A, Barakat M, El-Frakahany H, Xu J, Sakkas D. Deoxyribonucleic acid repair and apoptosis in testicular germ cells of aging fertile men: the role of the poly(adenosine diphosphate-ribosyl)ation pathway. *Fertil Steril* 2009; 91(5), 2221-9.
- Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl.* 2002; 23(6):737-52.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004; 82(2):378-83.
- Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G: Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Human reproduction* 2005, 20(7):1921-1927.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G: Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human reproduction* 2005, 20(12):3446-3451.
- Shaman JA, Ward WS. Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. Chapt. 2; 31-48: Jonge, CJD, Barratt CLR. 2006. *The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration.* Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Sharma R, Agarwal A. Spermatogenesis: an overview. pp:19-44. Zini A, Agarwal A (eds.), *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Application in Male Infertility and Assisted Reproduction.* Springer NY, 2011.
- Sharma RK and Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48, 835–850.
- Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology.* 2010; 76(6):1380-6.

- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215, 213–219.
- Simon L, Carrell DT: Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods Mol Biol* 2013, 927:137-146
- Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, Hotaling J, Carrell DT. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod.* 2014; 29(11):2402-12.
- Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl.* 2017; 19(1):80-90
- Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril.* 2003; 80(6):1420-30.
- Smit M, van Casteren NJ, Wildhagen MF, Romijn JC, Dohle GR. Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum Reprod.* 2010; 25(8):1877-83.
- Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Morales I, Ríos R, Castro A. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress. *Rev Med Chil.* 2007; 135(3):279-86.
- Spitteler G. Review: on the chemistry of oxidative stress. *J Lipid Mediators* 1993; 7, 77–82.
- Sukanuma, Yanagimachin R, Meistrich ML. Decline in fertility of mouse sperm abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod* 2005; 20, 3101-8.
- Suleiman SA, Elamin Ali M, Zaki ZMS, El-Malik EMA and Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996; 17, 530–537.
- Sutovsky P & Manandhar G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and comportamental analysis. Chapt. 1: Jonge, CJD, Barratt CLR. *The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration.* Cambridge, 2006. UK: Cambridge University Press.

- Tavukçuoğlu IŞ, Al-Azawi T, Khaki AA, Khaki A, Khalil A, Al-Hasani S. Clinical value of DNA fragmentation evaluation tests under ART treatments. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2012;13:270-4.
- Tournaye H, Krausz C, Oates RD. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017; 5(7):544-553.
- Trussell JC. Optimal diagnosis and medical treatment of male infertility. *Semin Reprod Med* 2013; 31:235-6.
- Twigg J, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998; 13, 1864–1871.
- Uriondo H, Alvarez Sedó C, Gil MV, Frazer P, Serna J, Nodar F. Niveles de correlación entre la externalización de fosfatidilserina y apoptosis espermática en pacientes con infertilidad masculina. *Reproducción.* 2011; 26 (3): 111-116.
- Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG Jr. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15(5):514-9.
- van Roijen HJ, Ooms MP, Spaargaren MC, Baarends WM, Weber RF, Grootegoed JA, Vreeburg JT. Immunoeexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Human Reproduction* 1998; 13(6):1559-66.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004; 81(5):1289-95.
- Warren JS, Johnson KJ, Ward PA. Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathol Immunopathol Res.* 1987; 6 (5-6):301-15.
- Włodarczyk M, Nowicka G. Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(5): 1146.

- Wong WY, Thomas CM, Merkus JM, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil Steril*, 2000;73(3), 435-442.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010.
- Wu GJ, Chang FW, Lee SS, Cheng YY, Chen CH, Chen IC. Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertil Steril*. 2009; 91(3):831-7.
- Zidi-Jrah I, Hajlaoui A, Mougou-Zerelli S, Kammoun M, Meniaoui I, Sallem A, Brahem S, Fekih M, Bibi M, Saad A, Ibala-Romdhane S. Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2016; 105(1):58-64.
- Zini A & Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of Assisted reproduction. *CMAJ* . 2006; 175 (5): 495-500