

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN**

***Fragmentación del ADN espermático en muestras
procedentes de Clínicas de Reproducción Asistida***

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

Natalia Molinero García

Tutor: Dr. Felipe Martínez Pastor

JUNIO 2014

Índice

1. Introducción	4
1.1. Posible origen de los daños en el DNA.....	7
1.2. Efectos del daño en el DNA y posibles soluciones.....	11
1.3. Aplicación clínica y técnicas disponibles.....	16
1.3.1. Técnicas de tinción.....	16
1.3.2. Metodologías modernas	18
TUNEL	19
In Situ Nick Translation (ISNT)	20
COMET	20
Sperm Chromatin Dispersion (SCD).....	22
DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH).....	24
1.4. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)	24
1.4.1. Variables obtenidas del análisis por SCSA.....	27
1.4.2. Utilidad y aplicación de la técnica.....	29
2. Hipótesis y objetivos	32
3. Materiales y métodos	33
3.1. Diseño experimental.....	33
3.2. Preparación de la solución TNE.....	34
3.3. Preparación de las muestras en clínica.....	34
3.4. Preparación de la muestra estándar.....	35
3.5. Preparación de solución detergente-ácida y solución de tinción	36
3.6. Citómetro de flujo	37
3.7. Puesta a punto del software de adquisición.....	39
3.8. Preparación del análisis y encendido del citómetro	40
3.9. Ajuste de los parámetros del citómetro con la muestra estándar	42
3.10. Análisis de las muestras de semen	43
3.11. Apagado del citómetro	44
3.12. Análisis de los archivos de citometría.....	44
3.13. Análisis estadístico.....	46
4. Resultados	48
4.1. Análisis general de todo el conjunto de muestras.....	48
4.2. Estudio general de los análisis con más de 1000 eventos.....	52

4.3. Clasificación y estudio de los datos para los parámetros derivados del SCSA: x -DFI, SD-DFI, %DFI y %HDS	52
4.4. Análisis de los datos en las categorías de %DFI.....	57
4.5. Análisis de los datos en las categorías de %HDS.....	61
4.6. Asociación entre %DFI y %HDS.....	63
5. Discusión.....	64
6. Conclusiones	72
7. Agradecimientos.....	73
8. Referencias bibliográficas.....	73

1. Introducción

La esterilidad afecta aproximadamente a un 20% de las parejas que se encuentran en edad reproductiva. Este fenómeno parece afectar de la misma forma a ambos sexos, de forma que en un 50% de los casos el factor masculino parece ser el causante de la infertilidad (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007; Evenson *et al.*, 2002). Para poder determinar si el factor masculino es el involucrado en la situación de infertilidad, es necesario un análisis exhaustivo de las características seminales del paciente. Para llevar a cabo este estudio, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido una serie de parámetros cuyo análisis rutinario es fundamental en un laboratorio de andrología, a la vez que proporciona una descripción detallada de los métodos y sus limitaciones (Cooper *et al.*, 2010). Entre estos parámetros podemos destacar aquellos de análisis macroscópico, como el estudio del volumen de eyaculado, pH, color y apariencia, viscosidad; y aquellos de estudio microscópico como concentración espermática, motilidad, vitalidad y morfología, entre otros. Para todas estas características se han establecido unos valores umbrales, tanto para el estudio cualitativo como para el cuantitativo, que nos permiten estimar si una muestra entra dentro de los valores de la normalidad o puede considerarse patológica. Sin embargo, en muchos casos, un 15% de los pacientes con problemas de fertilidad presentan un seminograma considerado como normal (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). Por tanto, el estudio de estas características no siempre es concluyente. Es necesario añadir el estudio de otros parámetros como la evaluación de la actividad enzimática, la integridad del acrosoma o de la membrana. A pesar de ello, ninguno de estos parámetros puede ser considerado de valor diagnóstico absoluto y es necesaria la combinación de todos ellos para poder llegar a una conclusión.

Cuando utilizamos técnicas de reproducción asistida (TRA), el proceso puede hacerse más complejo. La naturaleza proporciona de forma natural múltiples obstáculos, de forma que sólo el espermatozoide más apto alcanza el ovocito y lo fecunda. Sin embargo, cuando se realizan TRA, estos procesos de selección no están presentes, y por tanto, debemos simularlos nosotros. En estos casos, la calidad de la muestra requiere un control más delicado y mucho más exigente en comparación con la reproducción normal. Esta exigencia se debe a que en este tipo de situaciones se recurre a técnicas

como la fertilización *in vitro* (FIV) o la microinyección citoplasmática de espermatozoides (ICSI), que conllevan manipulaciones técnicas específicas y por otra, al simple hecho de que la necesidad de recurrir a esta clase de técnicas lleva implícito que puede existir algún problema que interfiere con la concepción normal (Check *et al.*, 2005).

En el proceso de fecundación, es fundamental la integridad genética materna y paterna para que el proceso tenga éxito. La transferencia de la molécula de DNA intacta por parte del espermatozoide es crucial no sólo para la fecundación, sino también para el posterior desarrollo del embrión y el feto (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). La presencia de defectos en el DNA, como fallos en la condensación de la cromatina, anomalías en la integridad del DNA o fragmentación, que puede afectar a una sola cadena o a ambas, o la presencia de anomalías cromosómicas, como aneuploidías o reordenaciones genómicas estructurales, pueden ocasionar problemas y se encuentran estrechamente asociados con la infertilidad (Aravindan *et al.*, 1997).

La cromatina espermática es una estructura compacta, insoluble y altamente organizada, que presenta una compactación del DNA unas cinco veces superior al de las células somáticas. Este DNA se organiza en bucles que son de un tamaño inferior a los que se forman en las células somáticas, y que se generan gracias a las protaminas, un tipo de nucleoproteínas que presentan una capacidad mucho mayor de compactación que las histonas. Las protaminas además, tienen la función de dar estabilidad a la estructura mediante la formación de puentes disulfuro entre ellas (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). Su naturaleza insoluble protege el material genético durante el transporte por el tracto masculino y femenino. En comparación con otras especies, la cromatina espermática humana es excepcionalmente variable entre cada espermatozoide y entre cada paciente. Aunque los espermatozoides humanos suelen presentar una estructura de la cromatina homogénea y densa, existe una proporción considerable que puede mostrar un aspecto grueso, granular o con vacuolas de diverso número y tamaño. Estas variaciones pueden encontrarse en espermatozoides morfológicamente normales y son similares a las observadas en espermátidas tardías. Por lo tanto, la presencia de este tipo de cromatina puede indicar inmadurez espermática (Evenson *et al.*, 2002). La variabilidad en la estructura de la cromatina también se relaciona con el contenido en protaminas. En función de la cantidad de estas nucleoproteínas presentes en la

estructura, habrá mayor o menor compactación. En contraste con el toro, rata, carnero, jabalí y conejillo de indias, cuyos espermatozoides contienen sólo un tipo de protamina (P1), la cromatina espermática humana incluye un segundo tipo de protamina, la P2. Esta segunda protamina P2 tiene un menor nivel de grupos sulfidrilo libres disponibles para generar enlaces disulfuro, lo que hace que la cromatina humana sea menos estable (Jager *et al.*, 1990). Además, P2 se sintetiza como un precursor, y cualquier anomalía en la escisión proteolítica del precursor de P2 puede actuar como una fuente adicional de heterogeneidad de la cromatina de espermatozoides humanos y la infertilidad (Evenson *et al.*, 2002).

La fragmentación del DNA se define como la presencia de interrupciones en el DNA presentes en cadena simple o cadena doble. Ésta se presenta frecuentemente en pacientes con problemas de fertilidad, y se ha comprobado que la proporción de DNA fragmentado es superior en pacientes infértiles que en varones con fertilidad probada. Además, se ha encontrado en pacientes cuyo seminograma está alterado mayor porcentaje de daño en el DNA que en aquellos pacientes con un seminograma normal. (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). La fragmentación es algo común, que se presenta frecuentemente en los varones en mayor o menor proporción. Dependiendo del porcentaje en el que se presente, dará lugar o no a problemas en la fertilidad. Investigaciones independientes han demostrado que en aquellas parejas donde el eyaculado del varón presenta un alto porcentaje de fragmentación (entre el 30% y el 40%) se observa un potencial muy bajo de fertilidad natural (Zini *et al.*, 2001). Los espermatozoides que presentan daño en el DNA son capaces de fecundar el ovocito de forma eficiente *in vitro*. En ciertos casos, el ovocito es capaz de reparar el daño del DNA del espermatozoide tras la fecundación. Sin embargo, esto depende del tipo de lesión de la molécula, la cantidad de fragmentación que presenta y evidentemente, de la calidad ovocitaria. En aquellos casos en que el ovocito no es capaz de reparar las lesiones del material genético, la cuestión es qué tipo de efectos puede suponer para el desarrollo del embrión, y en un futuro el del feto, la presencia de fragmentación en el DNA del espermatozoide (Sakkas and Álvarez, 2010).

1.1. Posible origen de los daños en el DNA

El origen del daño en el DNA espermático no se conoce exactamente. Se trata de un resultado cuya causa es multifactorial y en el que interviene una casuística que aún no se ha delimitado completamente. Se puede producir fragmentación tanto del DNA mitocondrial como del DNA nuclear, y puede ser provocada por seis mecanismos distintos (Sakkas and Álvarez, 2010). Estos procesos pueden ocurrir durante la espermatogénesis o el transporte espermático (*Figura 1*).

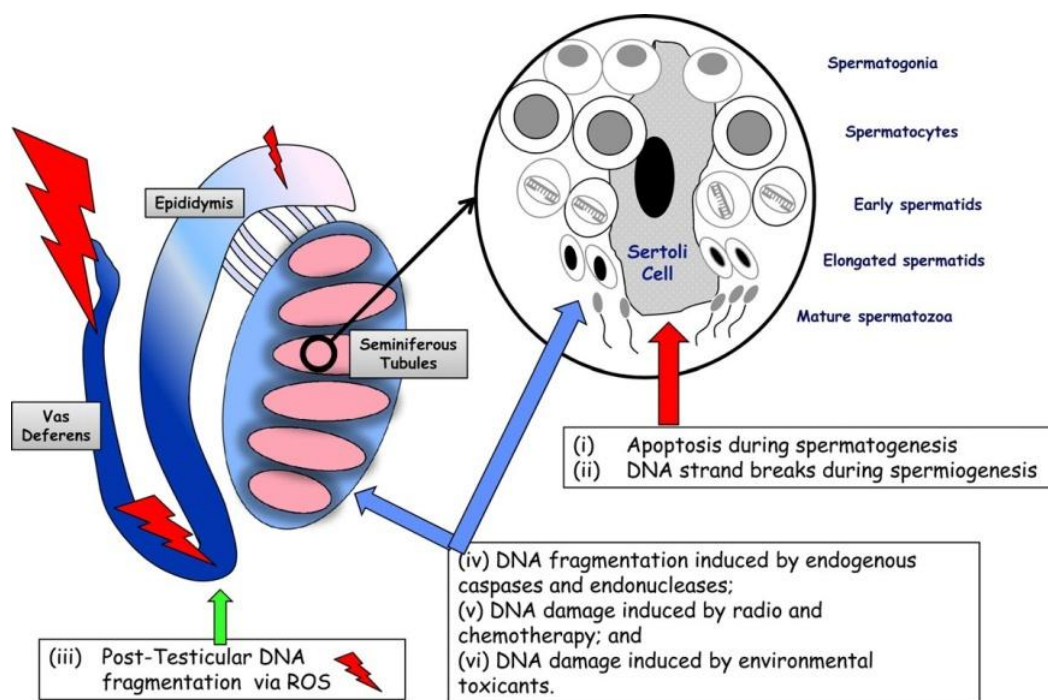


Figura 1: Posibles causas del daño en el DNA espermático (Sakkas and Álvarez, 2010).

El primer mecanismo implicado es la inducción de la apoptosis durante el proceso de espermatogénesis. Las células de Sertoli son responsables de la inducción de apoptosis en el 50% de las células germinales que se encuentran en la meiosis I aproximadamente. Estas células entran en apoptosis por la vía extrínseca (Fas y su receptor) y deben ser fagocitadas por las células de Sertoli, ya que tienen algún tipo de anomalía que las impide seguir con el proceso (Billig *et al.*, 1996; Pentikäinen *et al.*, 1999). En caso de que éste mecanismo falle, una parte de estas células germinales defectuosas terminarán la meiosis y por lo tanto continuarán el mismo proceso de

remodelación que el resto de espermatozoides. Además, según Burrello *et al.* (2004), existe una disociación entre calidad genómica y morfología, es decir, un espermatozoide cuyo DNA está dañado y que debería haber sido fagocitado puede tener morfología normal. De este modo, un espermatozoide morfológicamente normal, no tiene necesariamente por qué tener una calidad genómica normal. Por otro lado, también se ha demostrado que en pacientes oligospermicos, la probabilidad de que un espermatozoide con morfología normal esté dañado genéticamente es mucho mayor que en pacientes normozoospermicos (Burrello *et al.*, 2004).

Otro aspecto muy importante en la espermatogénesis es el papel que desempeñan las gonadotropinas y la testosterona. El curso de un proceso normal de espermatogénesis depende de la secreción por parte de la hipófisis de las gonadotropinas FSH y LH, y de la correcta secreción testicular de testosterona. Fallos en este sentido pueden provocar graves problemas no sólo metabólicos, sino también a nivel de fragmentación en el DNA espermático. Se ha demostrado recientemente que niveles muy altos de FSH y LH o muy bajos de las mismas están directamente relacionados con altos porcentajes de fragmentación de DNA. Además, parece haber una relación negativa entre los niveles de testosterona y la fragmentación del DNA espermático (Wdowiak *et al.*, 2014).

El daño en el DNA espermático también puede producirse por alteraciones en la remodelación de la cromatina durante el proceso de espermiogénesis. Parece ser que el empaquetado de la cromatina puede requerir actividad endonucleasa para que se lleve a cabo de forma correcta la protaminación, y alteraciones en el control de este proceso podrían resultar en la presencia de anomalías en el empaquetamiento de la cromatina o roturas en la hebra de DNA. La presencia de estas roturas en el material genético puede ser indicativa de una maduración incompleta durante la espermiogénesis (McPherson *et al.*, 1993; Sakkas *et al.*, 2010).

En esta etapa de espermatogénesis, existen procesos de reparación de DNA, pero de forma limitada y sólo durante ciertas etapas específicas. Estos mecanismos son necesarios para reparar nicks inducidos y roturas de la cadena, de forma que posteriormente pueda producirse una correcta remodelación de la cromatina. Es muy importante que los mecanismos de reparación sean eficaces en este momento, ya que

estos no se activan durante la condensación nuclear en el epidídimo (Leduc *et al.*, 2008), y la próxima oportunidad se presentaría tras la fertilización del ovocito, esperando que éste sea capaz de reparar los daños del DNA espermático (Wright *et al.*, 2014).

Por otro lado, también puede producirse fragmentación del DNA espermático post-testicular. Varios estudios muestran que los espermatozoides inmaduros, que producen altos niveles de radicales libres (ROS), pueden inducir daño en el DNA de los espermatozoides maduros (Lopes *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2000). Esto es consistente con el hecho de que la co-centrifugación de espermatozoides inmaduros (que producen altos niveles de ROS) con espermatozoides maduros da como resultado la inducción de fragmentación de ADN en los espermatozoides maduros, ya que bajo estas condiciones, los espermatozoides maduros e inmaduros están en estrecho contacto. Además, las células epiteliales del epidídimo también podrían desempeñar un papel activo en el daño del ADN inducido por ROS, así como los leucocitos circulantes (Twiggg *et al.*, 1998). Aunque la vida media de los ROS es del orden de nanosegundos a microsegundos, los espermatozoides se encuentran concentrados en el epidídimo, lo que facilita el daño al DNA (Sakkas and Álvarez, 2010). El estrés oxidativo puede afectar a los componentes celulares, en particular a los lípidos, proteínas y DNA. En fertilidad, los dos efectos principales de los ROS son la peroxidación lipídica y del DNA. El ácido docosahexapentanoico es un ácido graso poliinsaturado predominante en la membrana de espermatozoides inmaduros, y su cantidad se reduce durante la maduración en el epidídimo. La presencia de este ácido hace las membranas espermáticas especialmente vulnerables a la peroxidación lipídica, cuyos productos son mutagénicos y genotóxicos para el DNA. Los ROS pueden dañar directamente el DNA por la generación de derivados oxidados como por ejemplo N6-etenoguanosina, procesos de nitración y desaminación, que pueden dar lugar a sitios que desestabilizan la estructura del ADN y causar roturas en una de las cadenas, o indirectamente, a través de la activación de caspasas (Wright *et al.*, 2014). La peroxidación lipídica y del DNA se ha relacionado con el daño en el DNA, detención de la maduración, la disminución de la concentración de espermatozoides y la morfología y , sobre todo , la movilidad , debido a alteraciones en la membrana (Atig *et al.*, 2012; Benedetti *et al.*, 2012).

Los fallos post-testiculares juegan un papel especialmente importante en la fragmentación del ADN espermático. Esto se fundamenta en hallazgos anteriores, donde se indica que la fragmentación es mayor en el epidídimo y en el eyaculado en comparación con los espermatozoides testiculares (Ollero *et al.*, 2001; Greco *et al.*, 2005).

En cuanto a factores externos, nos encontramos ante un campo muy amplio de estudio. En este sentido, una posible causa de la fragmentación del DNA espermático es la aplicación de quimioterapia o radioterapia. Los tratamientos oncológicos afectan negativamente a la fertilidad masculina, produciendo una reducción en la producción espermática debido a los efectos citotóxicos de la quimioterapia o radioterapia en el epitelio testicular (Morris *et al.*, 2002). Por otro lado, aunque aún se conoce poco sobre la fragmentación del DNA espermático en pacientes con cáncer, se ha demostrado que la integridad del DNA y la compactación del mismo se ven afectados en pacientes con cáncer testicular y linfoma de Hodgkin antes de la quimioterapia (O'Flaherty *et al.*, 2008), lo que quiere decir que al menos algunos tipos de cáncer, per sé, son una causa de fragmentación de DNA.

Otra causa externa es el daño producido por tóxicos ambientales. Se ha demostrado que existe una asociación entre la exposición a altos niveles de contaminación del aire y el aumento de los daños del DNA espermático en el ser humano. Por ejemplo, se ha demostrado que aquellos hombres que carecen de forma homocigótica de la glutatión-S-transferasa M1 tienen mayor dificultad para metabolizar y desintoxicar ciertos metabolitos cancerígenos reactivos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en la contaminación del aire (Rubes *et al.*, 2007). En consecuencia, estos varones son más susceptibles a los efectos de la contaminación atmosférica sobre la cromatina espermática. Otros factores ambientales que pueden afectar a la integridad del DNA es el uso de ciertos agentes tóxicos, como el carbaril (Xia *et al.*, 2005), la presencia de pesticidas como el diclorodifenildicloroetileno (p, p'-DDE) o el Lindano (Pant *et al.*, 2014), el uso de ciertos fármacos o el tabaquismo (Fraga *et al.*, 1996; Sepaniak *et al.*, 2006).

Por otro lado, patologías como la presencia de episodios de fiebre alta, inflamación crónica (Allam *et al.*, 2008), infecciones (Gallegos *et al.*, 2008) o

anomalías anatómicas tales como el varicocele (Smith *et al.*, 2006), también se han relacionado directamente con la presencia de daños en el DNA. Del mismo modo, los hábitos de vida, como la dieta y el ejercicio, las prendas que utilizemos, que pueden provocar una temperatura testicular elevada, y por supuesto la edad, están relacionados con la fragmentación del DNA espermático (Evgeni *et al.*, 2014).

Los efectos perjudiciales de estos factores son posiblemente sinérgicos. Por ejemplo, el fallo de algunos de los procesos que intervienen en la espermiogénesis, como por ejemplo una pobre compactación de la cromatina, puede producir espermatozoides que pueden ser más susceptibles al estrés oxidativo más adelante (Evgeni *et al.*, 2014).

1.2. Efectos del daño en el DNA y posibles soluciones

El daño provocado en la cromatina espermática puede afectar en varios niveles, y de forma temprana en el desarrollo embrionario o tardía. Se relaciona con fallos de implantación y abortos de repetición, y por lo tanto, con bajas tasas de natalidad. Los efectos a nivel temprano implican fallos de fecundación, o fallos a nivel de activación de la expresión del genoma embrionario (Tesarik *et al.*, 2004). Estos efectos a veces son evidentes incluso en la fase de cigoto (Tesarik *et al.*, 2002). Por otro lado, los efectos a nivel tardío afectan negativamente al desarrollo salud del embrión, del feto e incluso la salud de la descendencia post-parto (Brinkworth, 2000). Además, se ha propuesto que el efecto de este daño puede asociarse a enfermedades que aparecen en la descendencia, tales como infertilidad, cáncer infantil o con enfermedades causadas por una impronta genómica anormal (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

La fragmentación espermática también se ha relacionado con los parámetros principales estudiados en un seminograma, es decir, concentración, motilidad y morfología. En humanos, se ha encontrado una estrecha relación entre los parámetros seminales anormales y la presencia de altos porcentajes de fragmentación en el DNA espermático. Se ha detectado un mayor porcentaje de fragmentación en pacientes con oligoastenoteratozoospermia (Irvine *et al.*, 2000; Zini *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2005). Por otro lado, Gandini *et al.* (2000), estudiando la relación entre apoptosis y los

parámetros seminales, también demostraron que un incremento de la fragmentación del DNA estaba relacionado con una disminución de la concentración espermática y la motilidad. Esta relación también ha sido estudiada posteriormente por otros autores, como Virro *et al.* (2004), Smit *et al.* (2007), o Evgeni *et al.* (2014), donde obtuvieron una relación directa negativa entre concentración, motilidad y morfología y el porcentaje de fragmentación de DNA de la muestra. Esta correlación se observó también entre la fragmentación y la morfología, donde los gametos que mostraban roturas en su DNA presentaban cabezas pequeñas y amorfas (Gandini *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2010). Sin embargo, existen otros estudios donde el daño en el DNA no siempre se relaciona con los parámetros seminales, y sólo un 30% de los varones con un porcentaje de daño superior al 27% presentaban astenozoospermia y/o oligozoospermia (Larson-Cook *et al.*, 2003). A pesar de que en la mayoría de los casos la fragmentación se relaciona con anomalías seminales, es muy importante destacar que el 8% de los varones con parámetros seminales normales (esterilidad de origen desconocida) también presentan fragmentación en su DNA (Morales *et al.*, 2007).

La tasa de fertilización en estos casos muestra una relación controvertida con el porcentaje de fragmentación. Algunos estudios no parecen relacionar ambos parámetros (Sakkas *et al.*, 1996; Larson-Cook *et al.*, 2003), sin embargo, otros autores demostraron una correlación negativa entre el porcentaje de daños en el DNA espermático y la tasa de fertilización tras la aplicación de FIV o ICSI, donde un nivel de daño elevado se asociaba con una baja tasa de fertilización (Sun *et al.*, 1997; Saleh *et al.*, 2003). Virro *et al.* (2004) determinaron la relación entre los resultados de SCSA y los resultados de FIV/ICSI. Las tasas de fertilización con FIV/ICSI no fueron estadísticamente significativas entre grupos con alto y bajo porcentaje de fragmentación. Por otro lado, Henkel *et al.* (2004) tampoco encontraron correlación entre daños en el DNA y la tasa de fertilización en ciclos de FIV/ICSI, por lo que no parece haber una relación clara entre ambos parámetros y no se tiene muy en cuenta en el día a día de las clínicas de reproducción asistida.

Hasta la fecha, existe un número limitado de estudios encaminados a estudiar los posibles tratamientos para reducir daños en el DNA espermático, y ningún tratamiento ha demostrado ser completamente eficaz. Por eso, son necesarios más estudios para poder descubrir un tratamiento exitoso y que permita mejorar la situación de pacientes

con un alto porcentaje de fragmentación. Se ha propuesto la hormona folículo estimulante (FSH) como un posible tratamiento en pacientes con oligoastenoteratozoospermia idiopática (IOAT), por su papel importante en el proceso de espermatogénesis. Parece ser que la administración de esta hormona en este tipo de pacientes induce un aumento en la tasa de embarazo, pero no afecta significativamente al número y motilidad de los espermatozoides, lo que sugiere que el tratamiento podría mejorar otras funciones de los espermatozoides. Además, se ha visto que tras 90 días de tratamiento con FSHr, pacientes con IOAT mostraron una reducción de los valores de fragmentación del DNA espermático (Colacurci *et al.*, 2012).

Otra posible solución que se ha planteado es el uso de agentes antioxidantes para mejorar la calidad de la integridad del DNA espermático de pacientes con altos niveles de fragmentación, en un intento de disminuir la formación de ROS y mejorar la fertilidad. Se ha demostrado que el tratamiento con vitamina C y vitamina E durante dos meses reduce el porcentaje de fragmentación de DNA de los pacientes sometidos al mismo en comparación con aquellos que recibieron placebo (Greco *et al.*, 2005). Sin embargo, más tarde el grupo de Ménézo *et al.* (2007) vieron un efecto contradictorio. El tratamiento durante 90 días con vitamina C y α -Tocoferol produjo una disminución del porcentaje de fragmentación del DNA (-19,1%, $P < 0,001$), lo que sugiere que al menos una parte de la fragmentación presente es producida por los ROS. Sin embargo, el tratamiento también condujo a un efecto negativo inesperado: un aumento en la descondensación de los espermatozoides (22,8%, $P < 0,001$) (Ménézo *et al.*, 2007). Esto puede deberse a la rotura de puentes disulfuro en las protaminas, o a la capacidad de las vitaminas antioxidantes, especialmente de la vitamina C, de abrir las redes de cisteína. Sea como fuere, este hecho podría interferir en la actividad del genoma paterno durante el desarrollo preimplantacional. En conclusión, el uso de antioxidantes tiene un efecto contradictorio y debe tenerse cuidado, eligiendo el mejor tipo de antioxidante para mejorar la calidad de los espermatozoides. No debemos olvidar que aunque disminuya el porcentaje de fragmentación, la calidad de la compactación de la cromatina también es crucial para un correcto desarrollo. No se recomienda aplicar este tipo de tratamiento en pacientes cuyo grado de descondensación de la cromatina es superior a un 20%, para evitar alcanzar el valor crítico de 28%. Por debajo de este valor, la relación riesgo-beneficio está a favor de la aplicación de un tratamiento antioxidante (Ménézo *et al.*, 2007).

Dentro de este campo, también se ha estudiado el efecto del tratamiento *in vitro* con zinc, D-aspartato y coenzima Q10 (CoQ10), con el fin de proteger las muestras seminales del daño al DNA. Los espermatozoides son especialmente vulnerables al estrés oxidativo causado por el desequilibrio en la cantidad de ROS, de forma que una concentración por encima o por debajo de la necesaria puede provocar daños en el DNA espermático. La principal fuente de ROS son los leucocitos presentes en el tracto reproductor masculino y los espermatozoides anormales, y el aparato reproductor contiene una completa gama de moléculas antioxidantes, enzimáticas y no enzimáticas (tales como las vitaminas C y E, ácido fólico, zinc, selenio, carnitina y carotenoides) que actúan controlando la cantidad de ROS y protegen a los espermatozoides de las altas concentraciones de los mismos (Talevi *et al.*, 2013). En este estudio, aplicaron una formulación nutraceútica, combinación de antioxidantes y micronutrientes compuesta por zinc, D-aspartato y CoQ10, desarrollada por Merck Serono, para ver su efecto protector sobre el semen. El zinc es un cofactor para metaloenzimas que participan en la transcripción del DNA y la síntesis de proteínas, y también tiene propiedades anti-apoptóticas y antioxidantes (Ebisch *et al.*, 2007). El D-aspartato es un aminoácido endógeno que se encuentra en el sistema nervioso y el sistema endocrino de diversas especies animales. Se han encontrado altas concentraciones de D-aspartato en las células de Leydig, en el líquido testicular y en los espermatozoides del epidídimo de ratón (D’Aniello *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1999), y la concentración de D-aspartato en el plasma seminal y en los espermatozoides humanos se encuentra reducida significativamente en pacientes oligoastenoteratozoospermicos (D’Aniello *et al.*, 2005). Finalmente, el CoQ10 es un componente de la cadena respiratoria mitocondrial, con poder antioxidante. La biosíntesis de la CoQ10 es altamente activa en testículo, y se han detectado altos niveles de su forma reducida, el ubiquinol, en los espermatozoides, lo que sugiere un papel protector como antioxidante (Talevi *et al.*, 2013). Se ha visto que existe una disminución de los niveles de CoQ10 y su forma reducida en el plasma seminal y espermatozoides de hombres con infertilidad idiopática y astenozoospermia asociada a varicocele (Balercia *et al.*, 2002) y, además, la administración exógena de CoQ10 parece mostrar una mejora en la motilidad de los espermatozoides (Balercia *et al.*, 2009). Tras el estudio, vieron que el tratamiento *in vitro* con zinc, D-aspartato y CoQ10 tiene un efecto protector directo, mejorando la motilidad espermática, y disminuyendo la peroxidación lipídica y la fragmentación del DNA. Esto indica que su

administración puede mejorar la situación de pacientes con grandes porcentajes de fragmentación (Talevi *et al.*, 2013).

Por otro lado, otra posible causa de daño en el DNA espermático es el varicocele. Este se asocia con altos niveles de fragmentación en el DNA de los espermatozoides debido posiblemente al estrés oxidativo. Se ha propuesto que una posible solución a este problema es la varicocelectomía, ya que después de someter a los pacientes a la misma, muestran una mejoría en la concentración, movilidad y morfología espermática, así como una disminución en el porcentaje de fragmentación del DNA (media preoperatoria de 42,6% a 20,5%, $p < 0,001$). Por lo tanto, estos datos sugieren que la varicocelectomía puede mejorar varios parámetros del semen y los daños en el DNA espermático en hombres infértiles con varicocele (Kadioglu *et al.*, 2014).

Recientemente, un grupo de investigadores han indicado que otra de las posibles soluciones parece radicar en modificar el tiempo de abstinencia sexual (Pons *et al.*, 2013). A pesar de que se recomienda un periodo de abstinencia de 2 a 7 días antes de la recogida de la muestra espermática (Cooper *et al.*, 2010), algunos autores han sugerido que 1 día de abstinencia podría conducir a la obtención de muestras seminales de mejor calidad. Levitas *et al.* (2005) evaluaron la relación entre la duración de la abstinencia sexual y diversos parámetros de calidad seminal en 9489 muestras de semen de 6.008 pacientes. Llegaron a la conclusión de que las mejores muestras seminales en pacientes con factor masculino se obtuvieron tras un día de abstinencia (Levitas *et al.*, 2005). Siguiendo este principio, se ha intentado reducir el porcentaje de fragmentación en el DNA reduciendo los días de abstinencia a uno. Los resultados mostraron una disminución en la fragmentación del DNA espermático reduciendo los días de abstinencia, lo que indica que un periodo de abstinencia sexual de un día puede ser un método simple, barato y efectivo de reducir la fragmentación del DNA espermático (Pons *et al.*, 2013).

En cuanto a los hábitos de vida, parece ser que podemos mejorar la calidad de la cromatina y disminuir el daño al DNA dejando de fumar, llevando una dieta sana, complementada con antioxidantes, y haciendo deporte. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, este campo es muy amplio, ningún tratamiento ha

demostrado ser completamente eficaz y existe un número limitado de estudios encaminados al descubrimiento de posibles tratamientos para reducir daños en el DNA espermático. Son necesarios más estudios para poder descubrir un tratamiento eficaz que logre reducir los porcentajes de fragmentación del DNA en aquellos pacientes con problemas de fertilidad (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

1.3. Aplicación clínica y técnicas disponibles

Debido a la incapacidad de los parámetros medidos de forma rutinaria en el laboratorio de andrología, como la morfología, concentración o motilidad, de predecir la fragmentación espermática, es fundamental disponer de técnicas capaces de dar una aproximación sobre la calidad y la integridad de la cromatina espermática. La evidencia creciente de que existe fragmentación en el DNA de espermatozoides morfológicamente normales, y los posibles efectos adversos que puede provocar hace de vital importancia su estudio. Estas técnicas, aparte de proporcionarnos información sobre la integridad de la cromatina espermática del paciente, nos permiten predecir la probabilidad de éxito antes de aplicar la TRA. Los avances en la preparación de las muestras, así como la capacidad de predicción resultante de la evaluación cuantitativa de la estructura de la cromatina espermática podrían ser el próximo gran avance en la asistencia a parejas con problemas de fertilidad. (Evenson *et al.*, 2002).

1.3.1. Técnicas de tinción

La primera técnica utilizada fue el uso de agentes intercalantes de DNA, flurocromos y tinciones. La cromatina espermática normal se une unas 5 veces peor a éstas moléculas en relación al DNA de las espermátidas, debido a la estructura más compacta e insoluble. Las técnicas de tinción más utilizadas son el azul de anilina y la cromomicina A3 (CMA3), que se han utilizado principalmente para medir anomalías en la condensación de la cromatina. El potencial del uso de estas técnicas radica en su capacidad de identificar una condensación anormal de la cromatina en espermatozoides morfológicamente normales y anormales (Hofmann *et al.*, 1991).

El azul de anilina tiñe selectivamente las histonas ricas en lisina. Se encontraron altos porcentajes de espermatozoides teñidos con azul de anilina en pacientes con teratozoospermia severa (Franken *et al.*, 1999), astenozoospermia, varicocele, infertilidad idiopática, o criptorquidia. (Evenson *et al.*, 2002). La tinción con azul de anilina se ha relacionado con el éxito de la FIV, sin embargo, esta relación no puede basarse sólo en la evaluación de la condensación de la cromatina. La relación con el éxito de la FIV puede ser que la tinción con este colorante indica fallos en la condensación, indicativos de una maduración anómala en el epidídimo y que puede relacionarse por otro lado con anomalías funcionales en los espermatozoides. Estas anomalías funcionales pueden incluir fallos en la motilidad progresiva y reacción del acrosoma, incapacidad para unirse a la zona pelúcida o una morfología anormal, que provocarían un fracaso en la FIV. Estas anomalías funcionales, y no las anomalías en la condensación de la cromatina, serían las causantes de estos fallos en la fecundación *in vitro*. La ICSI no tendría en cuenta estas anomalías funcionales, ya que inyectamos el espermatozoide directamente en el ovocito. Por todo esto, la tinción con azul de anilina queda limitada a la evaluación de la madurez espermática asociada con anomalías funcionales, que pueden conducir a una disminución en las tasas de fertilización después de la fecundación *in vitro*.

La cromomicina A3 (CMA3) es un fluorocromo específico para secuencias ricas en GC que compite con las protaminas en su unión al DNA. Por lo tanto, la tinción con CMA3 representa una herramienta útil para evaluar la calidad de la compactación de la cromatina y darnos información indirectamente sobre la cantidad de protaminación. (Manicardi *et al.*, 1995). La tinción con CMA3 se relaciona con un recuento bajo de espermatozoides, morfología anormal y bajas tasas de fertilización *in vitro* (Evenson *et al.*, 2002). Aunque la tinción CMA3 se asocia con morfología anormal, un 58% de las muestras de semen de pacientes tratados SUZI mostró morfología normal y tinción con CMA3 (Bianchi *et al.*, 1996), lo que indica que un alto porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales puede presentar anomalías en la estructura de la cromatina. Como se ha comentado anteriormente, esta técnica de tinción está limitada al estudio de anomalías en la compactación de la cromatina, sin embargo, ha conseguido relacionarse con la fragmentación del DNA, la fertilización y el posterior desarrollo embrionario, apreciándose que la fragmentación es más frecuente en aquellos espermatozoides deficientes en protaminas (Mohammad *et al.*, 2005).

1.3.2. Metodologías modernas

Debido a las limitaciones que presentan las técnicas de tinción y con el fin de poder identificar defectos más sutiles en el DNA y en la integridad de la cromatina, han aparecido diferentes técnicas que nos permiten detectar espermatozoides viables y nos proporcionan valores umbrales útiles para la infertilidad masculina. Estas técnicas pueden dividirse en dos grupos:

- 1.- Metodologías basadas en el marcaje de roturas (nicks) en la hebra de DNA, en una o las dos hebras. Dentro de este grupo se incluyen la técnica TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling) o el *In Situ* Nick Translation (ISNT).
- 2.- Técnicas que miden la desnaturalización de la cromatina espermática frente a la exposición a distintos tratamientos. Dentro de estas técnicas podemos destacar el ensayo COMET, el SCD (Sperm Chromatin Dispersion), el DNA Breakage Detection-Fluorescence *In Situ* Hybridization (DBD-FISH), una metodología que utiliza la hibridación *in situ* de ácidos nucleicos, y el SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), técnica utilizada por el equipo del Dr. Felipe Martínez Pastor y que es sobre la que se basa este trabajo.

En las *Tablas 1 y 2* se muestra un resumen de las metodologías utilizadas para evaluar alteraciones en el DNA de espermatozoides, así como de algunas de sus ventajas e inconvenientes en relación con la aplicación clínica de rutina (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

Tabla 1: Resumen de las metodologías basadas en el marcaje de roturas (nicks) del DNA (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

Método	Instrumental	Ventajas	Desventajas	Utilidad clínica
TUNEL	Microscopio Fluorescencia. Citometría de flujo.	Cumple con parámetros de control de calidad.	Equipo sofisticado y costoso.	Fertilidad masculina. Reproducción asistida. Pérdidas fetales.
ISNT	Microscopio Fluorescencia. Citometría de flujo.	Reacción de marcaje directo.	Equipo sofisticado y costoso.	Fertilidad masculina.

Tabla 2: Resumen de las metodologías basadas en medir la desnaturalización de la cromatina espermática frente a la exposición a distintos tratamientos (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

Método	Instrumental	Ventajas	Desventajas	Utilidad clínica
COMET	Microscopio Fluorescencia.	Bajo costo	Lento de ejecución. Requiere observador con experiencia.	Fertilidad masculina. Reproducción asistida. Criopreservación de esperma.
SCD	Microscopio Fluorescencia. Microscopio de campo claro.	Análisis simple de resultados.	Aún no determinada.	Aún no determinada. ¿Varicocele?
DBD-FISH	Microscopio Fluorescencia.	Bajo costo. Revela modificaciones estructurales de la cromatina.	Procedimiento sofisticado y costoso.	Aún no determinada.

TUNEL

Dentro del primer grupo, nos encontramos con el Ensayo TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling). Este consiste en la incorporación *in situ* de nucleótidos marcados en los extremos 3'OH libres de las hebras de DNA, que corresponderán con roturas en la misma. Los nucleótidos, en este caso deoxiuridina trifosfato (dUTP), pueden ir marcados con un fluoróforo, biotina o digoxigenina, o contar con alguna modificación como la adición de un sustituyente de bromo (Br-dUTP), y son incorporados gracias a la acción de una transferasa terminal (desoxinucleotidil transferasa, TdT). Después, los nucleótidos marcados se detectan mediante histoquímica en caso de marcaje con biotina o digoxigenina, directamente si se marcan con un fluoróforo, o con la ayuda de un anticuerpo específico (anti-Br-dUTP) que llevará marcaje fluorescente o que será reconocido por un segundo anticuerpo marcado. La señal de marcaje puede estudiarse por microscopía de campo claro (histoquímica), por microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo. En función de la cantidad de nicks que presente el espermatozoide en su DNA, veremos más o menos señal de marcado (Evenson *et al.*, 2002). Sin embargo, el estudio por microscopía de fluorescencia es lento, existe variabilidad intra e interobservador y es subjetivo, por lo que el análisis con citometría de flujo es una opción más rápida y objetiva. El citómetro

es una herramienta capaz de analizar individualmente cada célula y separarlas entre sí formando pequeñas subpoblaciones en función de la intensidad de fluorescencia que generan. Para ésta técnica, aquellos espermatozoides con mayor porcentaje de fragmentación mostrarán una mayor intensidad de fluorescencia, y formarán una pequeña población completamente diferenciada de aquellas formadas por los espermatozoides con menor fragmentación o sin fragmentación. La técnica ha tenido una buena aceptación, pero su uso no se aplica en la rutina diaria debido a que costosa, requiere un equipo sofisticado para su análisis (en caso de ser analizado por citometría de flujo) y requiere de personal especializado experto en el manejo de estos equipos (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

In Situ Nick Translation (ISNT)

La otra técnica para el marcaje directo de roturas es el *In Situ* Nick Translation (ISNT). Se trata de un procedimiento muy similar al TUNEL, donde nucleótidos de dTUP marcados con un fluoróforo, biotina o digoxigenina, son incorporados al DNA, con la diferencia de que dicha incorporación es realizada por la actividad exonucleasa de la DNA-polimerasa I, que utiliza la cadena complementaria como molde. Para evaluar los resultados es necesario el uso de microscopía de campo claro, de fluorescencia, o también es posible hacerlo de forma más rápida por citometría de flujo, de forma similar al método TUNEL. Independientemente de la técnica que utilicemos para la evaluación, el ISNT nos permite cuantificar las roturas presentes en el DNA en función de la intensidad de señal producida. Esta técnica se ha utilizado en el estudio de la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide (Gorczyca *et al.*, 1993). Desde el punto de vista práctico, esta técnica tendría las mismas ventajas e inconvenientes que la técnica TUNEL, pero no existe disponible de modo comercial para su aplicación directa por lo que no es una técnica rutinaria en clínica.

COMET

En el segundo grupo de técnicas, nos encontramos con aquellas basadas en medir la capacidad de desnaturalización de la cromatina espermática. Desde que Calvin y Bedford (1971) mostraron la importancia de los puentes disulfuro en la compactación

de la cromatina espermática, el análisis de la estructura de la cromatina espermática ha sufrido una gran evolución. La rotura de estos puentes disulfuro mediante agentes reductores y la eliminación de las proteínas presentes con el uso de soluciones específicas de lisis generan la relajación de los bucles de DNA y su descondensación. Basándose en este principio, apareció la técnica COMET. Se introdujo por primera vez en 1984 por Östling y Johanson como una técnica para la visualización microelectroforética del daño en el DNA en células individuales (Östling and Johanson, 1984). Esta técnica es realmente una adaptación de la electroforesis común, basada en que el DNA de un núcleo desproteinizado que contenga roturas en sus hebras migrará más hacia el polo positivo cuando sea sometido a un campo eléctrico (Aravindan *et al.*, 1997). El proceso consiste en preparar un microgel de agarosa, e incluir la muestra en su interior. La mezcla, situada sobre un portaobjetos, es desnaturalizada y posteriormente se somete a una solución de lisis que contiene DTT (ditiotreitól), un agente reductor de grupos sulfhidrilo. Este agente rompe los enlaces disulfuro presentes en las protaminas, provocando la descondensación de la cromatina. El gel con la muestra se somete a electroforesis, y tras la misma, se tiñe con un colorante de unión al DNA del tipo DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole), IP (ioduro de propidio) o SYBR-Green. El DNA se desplaza generando una imagen similar a la de un cometa, de ahí su nombre. Aquellos espermatozoides cuyo DNA carezca de roturas, apenas producen colas de cometa, mientras que aquellos núcleos que tienen su DNA dañado muestran un claro desplazamiento de los múltiples fragmentos de DNA. Los resultados pueden analizarse de forma visual (dependiendo del colorante será necesario el uso de luz UV, que conlleva la aplicación de precauciones para evitar daño en el observador), y aunque este método carece de la sofisticación de los sistemas de análisis de imagen, ha sido utilizado con cierto éxito. El análisis con técnicas de imagen ha mejorado la sensibilidad de las medidas, lo que ha permitido distinguir entre las subpoblaciones que presentan sutiles variaciones, y además permite determinar el total de fluorescencia que presenta el espermatozoide, que se equipara con el contenido de ADN en el núcleo y en la cola (Fairbairn *et al.*, 1995).

La desnaturalización en la técnica COMET puede llevarse a cabo en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 10$). En este caso, pueden identificarse roturas de DNA de cadena doble y cadena sencilla, lo que permite detectar daños en el DNA más sutiles. El pH alto facilita la desnaturalización y el desenrollado de la cromatina, de forma que permite la

visualización de roturas de cadena simple y roturas que sólo se manifiestan tras la exposición al álcali. Por otro lado, el ensayo puede hacerse en condiciones neutras, siendo entonces sensible a la presencia de roturas de doble cadena en el DNA y sólo a una pequeña proporción de roturas de cadena simple, hecho que se debe a que a $\text{pH} \leq 9$ no se produce desnaturalización del DNA. Este tipo de variación de la técnica parece ser más útil en la identificación del daño en el DNA relacionado con la infertilidad (Fairbairn *et al.*, 1995). Esta técnica se aplica de forma rutinaria en investigación, sin embargo, no ocurre de la misma forma en la rutina de un laboratorio de andrología. Esto se debe a que requiere del uso de material específico, como fuentes de electroforesis, requiere de la presencia de personal cualificado o de un programa de análisis de imagen específico para la interpretación de los resultados, y sobre todo, tiempo (en preparar todo el proceso pueden tardarse varias horas, y es necesario contar un mínimo de 400 espermatozoides para poder tener un resultado fiable) (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). A pesar de esto, se ha demostrado que el ensayo COMET proporciona medidas más exactas sobre el daño en el DNA que la técnica ISNT si se aplica una descondensación previa de la cromatina (Irvine *et al.*, 2000). Este mayor nivel de sensibilidad y precisión indica que en caso de que las metodologías disponibles se optimizasen, los parámetros obtenidos por la técnica COMET podrían ser relacionados con el éxito de las TRA (Evenson *et al.*, 2002).

Sperm Chromatin Dispersion (SCD)

El test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) se basa en el mismo principio que la técnica COMET, es decir, disponiendo los espermatozoides en un microgel de agarosa, sin embargo, no se lleva a cabo electroforesis, lo que facilita y simplifica el proceso. La muestra se mezcla con agarosa de bajo punto de fusión, y se deja solidificar sobre un portaobjetos. Después, se introduce en una solución de desnaturalización ácida, para pasar después a la solución de lisis, que contiene DTT. Finalmente se lava en tampón EDTA, se deshidrata y se deja secar. Los espermatozoides se tiñen con DAPI y se pueden observar con microscopía de fluorescencia, o pueden teñirse con el kit Diff-Quik para microscopía de campo claro. Tras el tratamiento, la cromatina espermática forma una serie de halos alrededor de la cabeza del espermatozoide (*Figura 2*). Aquellos que presenten fragmentación en su DNA no son capaces de formar bucles de DNA, observándose halos muy reducidos o ausentes. Por el contrario, aquellos los

espermatozoides cuyo DNA esté intacto y no presenten fragmentación, mostrarán halos de gran tamaño alrededor de la cabeza del espermatozoide (Fernández *et al.*, 2003). Analizando el tamaño de los halos podemos determinar la proporción de fragmentación en la muestra de espermatozoides (Fernández *et al.*, 2005). También es posible actualmente realizar el estudio de la muestra de forma automatizada, mediante programas de análisis de imagen (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

En comparación con el COMET, la ventaja más importante de esta técnica es que determinar los resultados no implica determinar la cantidad de color o de fluorescencia, está comercializado en forma de kit (Halosperm[®] de Halotech DNA[®]) y se trata de una observación fácil de llevar a cabo por un operario previamente preparado, ya que la imagen que produce es clara en la mayoría de los casos. Además, sólo requiere un microscopio de campo claro en su modalidad más sencilla. Dada su sencillez, se ha propuesto que la técnica SCD puede ser potencialmente utilizada como prueba de rutina en el estudio de fragmentación de DNA espermático en los laboratorios básicos de andrología. Las principales desventajas son que el operario puede tardar más de una hora en preparar las muestras (incubación, pipeteo, solidificación de la agarosa, etc.), es necesario analizar unos 500 espermatozoides para poder tener una visión generalizada de la muestra, lo que conlleva un tiempo del que quizás no dispongan los operarios, y que aún no existen muchos estudios por lo que no se tienen claros los puntos de corte para considerar una muestra problemática o no (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

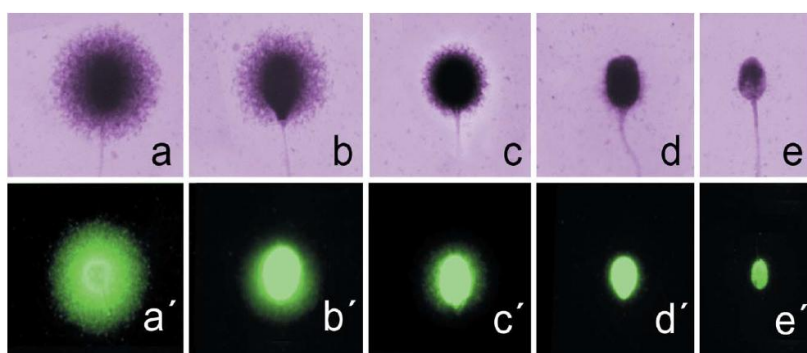


Figura 2: Visualización de la integridad del DNA mediante el test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) y visualización en microscopía de campo claro (a-e; tinción: colorante de Wright) y microscopía de fluorescencia (a'-e': tinción SYBR-Green). Mientras que los espermatozoides etiquetados como a y b, tienen su DNA integro, el resto presentan DNA fragmentado (ver DBD-FISH) (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH)

Otra técnica muy similar a las anteriores es el DNA Breakage Detection-Fluorescence *In Situ* Hybridization (DBD-FISH), un método que nos permite la detección *in situ* y cuantificación de roturas en secuencias específicas del DNA en células individuales. Se basa en la existencia de ciertas soluciones alcalinas, capaces de provocar desnaturalización en ciertos lugares sensibles del DNA o a partir de extremos 3'OH libres de roturas de hebra doble o simple. Después de la desnaturalización, se eliminan las proteínas de la misma forma que en las técnicas anteriores, y el DNA de cadena sencilla que ha quedado libre queda disponible para hibridar con una sonda de DNA marcada, por ejemplo, con DAPI. A mayor cantidad de fragmentación, mayor intensidad de marcaje mostrará la cabeza del espermatozoide (Fernández *et al.*, 2000). Las sondas pueden hibridar con regiones específicas o pueden ser sondas generales para el genoma completo. Para analizar los resultados de la aplicación de la técnica, se utilizan los mismos sistemas que para las técnicas de TUNEL o ISNT, es decir, puede estudiarse por microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo. Como ya se ha comentado anteriormente, el estudio por microscopía de fluorescencia es lento, y existe la posibilidad de variabilidad intra e interobservador, lo que hace cada vez más necesaria la aplicación de la citometría de flujo para analizar de forma rápida y segura los resultados de tales técnicas. La DBD-FISH es una técnica fundamentalmente utilizada en la investigación, donde tiene un gran interés ya que es la única técnica disponible para evaluar el daño de célula en célula, *in situ*, en secuencias específicas de DNA (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). Su aplicación rutinaria se ve dificultada por la necesidad de equipamiento específico y personal cualificado para la interpretación de resultados y manejo del sistema con el que se analicen.

1.4. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

Finalmente, nos encontramos con la técnica Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), creada y patentada por Donald Evenson *et al.* en el año 1980 (Evenson *et al.*, 1980). Se ha utilizado en gran cantidad de especies, entre las que destacan el toro (Ballachey *et al.*, 1987; Ballachey *et al.*, 1988; Evenson, 1999), verraco (Evenson *et al.*, 1994), gato doméstico (Penfold *et al.*, 2003) y, principalmente, humano. Con los datos

obtenidos de los análisis de muestras de humano, toro y algunos otros mamíferos se han ido establecido una serie de valores de referencia y umbrales predictivos de infertilidad. Se ha visto que la fertilidad *in vivo* disminuye progresivamente cuando más de un 20% de los espermatozoides muestran daños en el DNA, y se hace prácticamente cero cuando más del 40% de la población presenta daños (Spano *et al.*, 2000). Otros autores han visto que si aproximadamente más del 30% de los espermatozoides muestra daño en el DNA, la fertilización tanto *in vivo* como *in vitro* es propensa a fallar (Evenson *et al.*, 1999; Evenson and Wixon, 2006). Se podría pensar que con un porcentaje de daño en el DNA entre el 20% y el 40%, el resto de los espermatozoides, estarían intactos. Sin embargo, estas muestras no dan lugar a un desarrollo embrionario normal según la

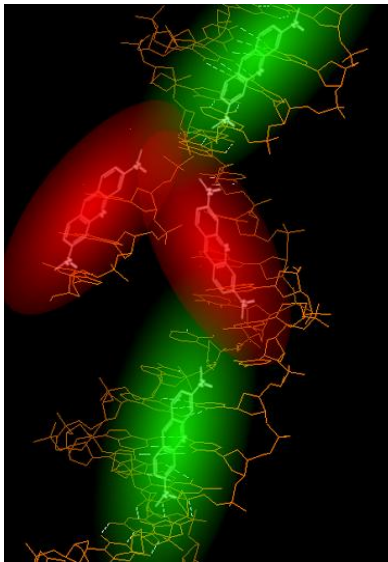


Figura 3: Unión del Naranja de Acridina al DNA y fluorescencia tras su excitación.

mayoría de los datos obtenidos. Esto puede deberse a que es posible que el daño detectable sólo represente la “punta del iceberg” y que exista un daño oculto en la mayoría de los espermatozoides que dan negativo en la prueba, o a que la fragmentación del ADN espermático esté asociada con anomalías cromosómicas (aneuploidías). Las aneuploidías durante la maduración espermática pueden dar lugar a una fragmentación del DNA como un mecanismo desarrollado para inactivar el espermatozoide genéticamente defectuoso, o bien puede suceder que durante la recombinación genética la existencia de roturas en el ADN dé lugar a aneuploidías (Morales *et al.*, 2007).

De forma rutinaria, las clínicas analizan principalmente la concentración, movilidad y morfología, ya que realizar técnicas como el SCD u otras explicadas con anterioridad requiere de un tiempo del que quizás no disponen y que son muy subjetivas en comparación con el SCSA. No obstante, la decisión de utilizar un citómetro de flujo es también compleja, ya que habría que aportar una inversión en equipos y personal cualificado. En aquellos centros donde se aplican técnicas para estudiar la integridad del DNA del espermatozoide, como la comercializada con el nombre Halosperm[®] de Halotech DNA[®] basada en el SCD, el análisis de los resultados se hace bajo el microscopio, contando entre 300 y 500 espermatozoides por muestra. Esto requiere de

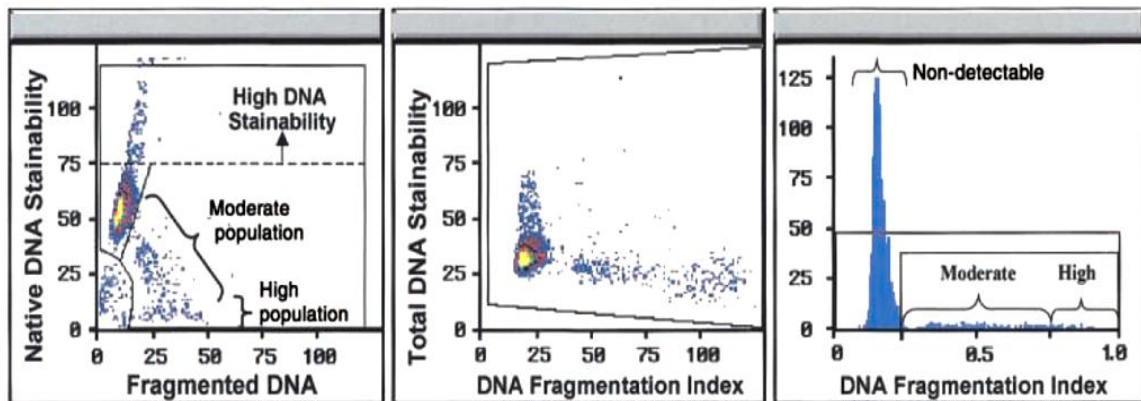
tiempo, no sólo para analizar los resultados, sino también en la preparación de las muestras para su estudio. Con la técnica SCSA pueden utilizarse muestras en fresco o que hayan sido congeladas y descongeladas, y gracias a la tecnología de la citometría de flujo analizar entre 5.000 y 10.000 células en menos de 5 minutos (Evenson *et al.*, 2002). Esta técnica rápida y fiable permite conocer la integridad del DNA de los espermatozoides de la muestra antes de realizar cualquier TRA con ella, lo que puede guiarnos hacia un tipo de técnica u otra, o decidir si una muestra puede ser congelada o no, en función de la calidad de su cromatina (Evenson and Jost, 2000).

Actualmente, el SCSA se viene considerando como el referente para el análisis de la fragmentación del DNA en el espermatozoide, y se trata de un ensayo muy repetible cuya finalidad es medir la susceptibilidad del DNA a la desnaturalización *in situ* tras ser sometido a un tratamiento de pH ácido que potencialmente induce la desnaturalización (Evenson and Jost, 2000). La técnica realmente es una adaptación del procedimiento original diseñado por Darzynkiewicz *et al.* (Darzynkiewicz *et al.*, 1975) para medir la cantidad de DNA y RNA en células somáticas utilizando como fluorocromo el naranja de acridina. Aplicando este principio al SCSA, cabría pensar que la señal producida por el RNA podría afectar a los resultados. Sin embargo, las cantidades de RNA presentes en el espermatozoide son mínimas, por lo que no interfieren en los datos obtenidos del SCSA (Evenson and Jost, 2000). La segunda parte de la metodología se fundamenta en las características metacromáticas del naranja de acridina. Este fluorocromo tiene la capacidad de intercalarse entre las dos cadenas de DNA y, al ser excitado, emite color verde, pero que presenta emisión en color rojo-anaranjado si se incorpora al DNA de cadena sencilla (*Figura 3*). Esto indica que aquellos espermatozoides que presenten fragmentación de DNA mostrarán mayor emisión rojo-anaranjado que los espermatozoides con DNA intacto. Las células así teñidas se someten a citometría de flujo para discriminar entre ambos tipos de color. También es posible analizar el resultado de la preparación por microscopía de fluorescencia, pero el mayor problema de esto es la subjetividad del observador en el momento de discriminar entre la emisión del color verde y el naranja de este fluorocromo, dado que existe toda una serie de colores intermedios que probablemente se relacionan con una sensibilidad diferencial a la desnaturalización de los distintos espermatozoides. Además los resultados obtenidos por microscopía no parecen muy reproducibles (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

1.4.1. Variables obtenidas del análisis por SCSA

Los resultados que nos muestra el citómetro son parecidos a los de la *Figura 4*. Es muy importante comprender cada una de las variables para el uso de todo el potencial de este protocolo.

(a)



(b)

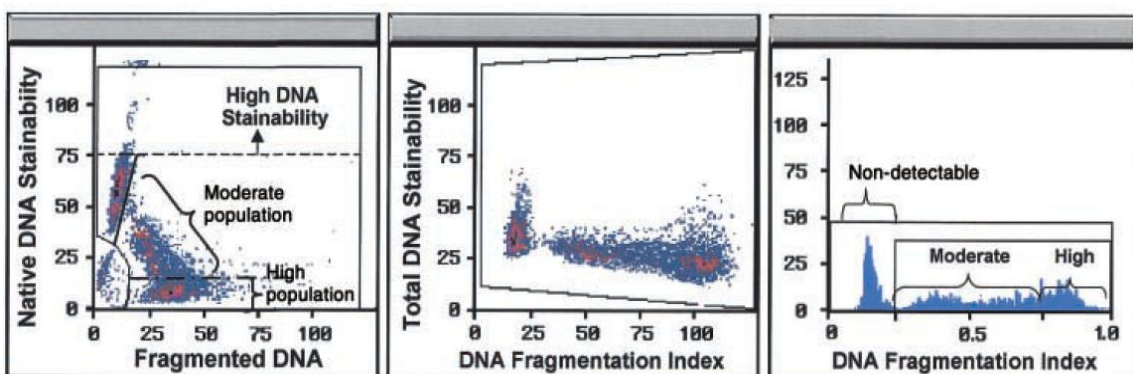


Figura 4: Ejemplos de gráficos de puntos FL3-H vs. FL1-H. Izquierda: FL3-H representa el DNA fragmentado (fluorescencia roja) y FL1-H representa el DNA estable (fluorescencia verde). Centro: citograma donde en el eje X se representa el DFI (DNA Fragmentation Index, fluorescencia roja con respecto a la fluorescencia total), y en el eje Y se muestra la fluorescencia total (roja y verde). En la derecha, vemos el histograma de DFI, con cada una de las subpoblaciones. (a) Las gráficas superiores se corresponden con una muestra con buena condición de la cromatina. (b) Las gráficas inferiores corresponden con una muestra con mala condición de la cromatina. Se aprecia el origen de varios parámetros: %DFI (%DFIm + %DFIh), %DFIm (Moderate), %DFIh (High) y %HDS (High DNA Stainability). (Evenson *et al.*, 2002).

El grado de desnaturalización del DNA se cuantifica por el parámetro DFI (DNA Fragmentation Index), que es el resultado de la fluorescencia roja dividida entre la fluorescencia roja y verde (fluorescencia total) (Darzynkiewicz *et al.*, 1975).

$$[\text{DFI} = \text{Rojo} / (\text{Rojo} + \text{Verde})]$$

Este valor se calcula para cada una de las células, que generalmente son más de 5000 por muestra (además, cada muestra se analiza por duplicado).

Los resultados del DFI se muestran en un histograma, junto con la media del DFI (x-DFI) y la desviación estándar (SD-DFI). La desviación estándar del DFI mide el grado de anormalidad en la estructura de la cromatina dentro de una población, y la media del DFI describe los cambios y las tendencias en toda la población de células. El porcentaje de células fuera de la población principal (células con DFI alto, $\geq 25\%$), denominado %DFI, indica el porcentaje de espermatozoides que presenta DNA desnaturalizado en un porcentaje medio-alto, y deriva del histograma donde está representado el DFI. Es muy importante no confundir el DFI, que es un índice que caracteriza a cada espermatozoide individualmente, con los parámetros globales de la muestra (x-DFI, SD-DFI o %DFI). Existe un parámetro más, %HDS (High DNA Stainability; también llamado %High Green, HIGRN), que no depende del DFI, sino de la intensidad de la fluorescencia verde de cada espermatozoide. Este parámetro es el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia verde por encima del canal 600 (puede variar según la especie y el tipo de muestra), y nos da información sobre el grado de descondensación de la cromatina. Mientras que los parámetros derivados de DFI están relacionados con una peor condición de la cromatina, %HDS se ha relacionado con inmadurez espermática.

El DNA de espermatozoides con una estructura anormal de la cromatina muestra un mayor porcentaje de fluorescencia roja, generando una distribución más amplia, aumentando la media del DFI, la desviación estándar (SD-DFI) y el %DFI global. El %DFI se ha determinado como el parámetro más importante para la evaluación de la fertilidad mientras que la desviación estándar SD-DFI se ha propuesto como una variable importante para los estudios de toxicología (Evenson and Jost, 2000).

1.4.2. Utilidad y aplicación de la técnica

En comparación con otras técnicas, como el TUNEL, COMET o el ISNT, el SCSA es una técnica más práctica, precisa y rápida para evaluar la integridad del DNA espermático. Existen decenas de estudios en animales y humanos, lo que indica que es una técnica aplicable a cualquier caso, que nos proporciona resultados objetivos, un nivel más alto de repetitividad que cualquier otro parámetro seminal, resultados con un alto grado de sensibilidad y precisión, y un umbral estadístico para poder realizar pronósticos acertados de fertilidad (Evenson *et al.*, 2002). La técnica SCSA por citometría de flujo es un ensayo objetivo que tiene la intención de eliminar el sesgo metodológico que dificulta los análisis microscópicos seminales. Aunque algunos estudios han concluido que los parámetros del SCSA también están sujetos a la variación biológica, los coeficientes de variación de los parámetros SCSA en un individuo son mucho más bajos que para los parámetros del semen clásicos (Evenson *et al.*, 1991; Zini *et al.*, 2001). Esto es consistente con un estudio que muestra que los coeficientes de variación (CV) para el %DFI y %HDS fueron significativamente más bajos en comparación con los CV de la concentración, motilidad progresiva y morfología normal (Smit *et al.*, 2007).

Además, la técnica aporta datos estadísticamente fuertes. Los resultados del diagrama de dispersión de una única muestra medida varias veces son prácticamente idénticos, y la correlación de sus valores está siempre cerca del 0,99 (Evenson and Jost, 2000). Esto ha permitido consensuar una serie de valores umbrales de porcentajes de fragmentación (DFI) para poder clasificar las muestras espermáticas en función de la integridad de su DNA, que se aplican en clínica actualmente de forma fiable. Esta clasificación es la siguiente: calidad excelente ($\leq 15\%$ %DFI, DNA Fragmentation Index, o porcentaje de DNA fragmentado), buena ($> 15\%$ a $<30\%$ %DFI), y pobre ($\geq 30\%$ %DFI) (Evenson and Wixon, 2006).

La técnica se ha aplicado en numerosos campos, tanto de la investigación como de la clínica. Se ha utilizado en numerosos estudios, que pretenden establecer una relación entre los parámetros obtenidos por SCSA y la infertilidad. Una de sus aplicaciones ha sido ver qué relación existe entre las variables del SCSA y los

protocolos de preparación de los espermatozoides para las TRA, como la centrifugación en gradiente o el *swim-up* (Larson *et al.*, 1999; Evenson *et al.*, 2002). Se ha visto que la separación por *swim-up* reduce drásticamente el porcentaje de espermatozoides identificado por SCSA con daños en la cromatina (daños $12\% \pm 8\%$ %DFI en las muestras no procesadas frente a $4\% \pm 3\%$ DFI en las muestras tratadas) (Larson *et al.*, 2000). Sin embargo, la mejora en la cromatina espermática tras la aplicación de TRA no se asoció con mejoras en las tasas de fertilización, la calidad del embrión o las tasas de embarazo. En lugar de ello, sólo el porcentaje de daños en el DNA obtenido tras el análisis de las muestras sin procesar fue predictivo de resultados negativos (Larson *et al.*, 2000).

Otra de las aplicaciones de la técnica es su uso para establecer la relación entre fragmentación del DNA espermático y el éxito de las técnicas de reproducción asistida propiamente dichas. Existen estudios donde ningún paciente tras FIV o ICSI logró embarazo cuando el %DFI detectado por SCSA era superior al 27% (Larson *et al.*, 2000), aunque en otros estudios sí consiguieron embarazo tras la aplicación de estas técnicas en hombres con DFI superiores al 27% (Bungum *et al.*, 2004). La técnica ha permitido detectar una relación negativa entre %DFI y el éxito de las TRA, consistente con las observaciones de otros estudios donde encontraron que un %DFI en semen fresco por encima del 30% se correspondía con bajas tasas de formación de blastocisto y bajas tasas de embarazo (Virro *et al.*, 2004). Bungum y colaboradores compararon las tasas de embarazo, tanto en ciclos de IA (Inseminación Artificial) como en ciclos de FIV/ICSI, entre el grupo de varones que presentaba una fragmentación inferior al 27% y el grupo en que dicha fragmentación era superior a este valor. Observaron que en ciclos de IA las tasas de embarazo clínico y de niño nacido eran cuatro veces inferiores en los varones con %DFI por encima del 27%; sin embargo, en ciclos de FIV/ICSI estas tasas prácticamente no variaban (Bungum *et al.*, 2004). Esto es porque como ya se ha explicado anteriormente, la selección por gradientes o *swim-up* reduce significativamente el porcentaje de %DFI (Larson *et al.*, 2000), y en el caso de la FIV, se produce una selección “natural” (Morales *et al.*, 2007). Comparando los resultados de FIV e ICSI sí observaron diferencias entre ambas técnicas, ya que en FIV la tasa de embarazo era la mitad que en ICSI cuando el %DFI superaba el valor umbral. Esta diferencia la atribuyeron a que en ICSI el observador selecciona el espermatozoide de

mejor motilidad y morfología y por tanto con mucha probabilidad el de menor nivel de fragmentación (Bungum *et al.*, 2004).

La técnica también se ha aplicado en el estudio de pacientes con globozoospermia, demostrando la independencia entre las características morfológicas y la estructura e integridad de la cromatina espermática (Larson *et al.*, 2001). Vieron que una muestra espermática con un 100% de anomalías morfológicas en la cabeza presentaba una integridad de la cromatina equivalente a muestras de espermatozoides fértiles. Esto indica que, en este tipo de pacientes, la aplicación de la técnica ICSI puede generar importantes tasas de éxito, y en caso de no ser así puede deberse a factores no relacionados con la integridad de la cromatina (Evenson *et al.*, 2002). Del mismo modo, el SCSA también se ha utilizado en estudios epidemiológicos para conocer la prevalencia de niveles altos de fragmentación en pacientes infértiles (Oleszczuk *et al.*, 2012), o en estudios para analizar la relación del %DFI con la edad (Moskovtsev *et al.*, 2006). En el estudio de Moskovtsev *et al.* (2006) se analizó mediante SCSA la fragmentación junto con otros parámetros seminales en grupos de varones de diferentes edades. Cuando las muestras del grupo de varones mayores de 45 años se compararon con aquellas de otros grupos se observó una diferencia significativa en tres parámetros: motilidad, vitalidad, y %DFI. Los varones de 45 años o mayores presentaban menor motilidad espermática que los varones más jóvenes, mientras que el %DFI era significativamente mayor. El %DFI en el grupo de mayor edad era superior al 30%, lo cual se corresponde con una baja fertilidad. Sin embargo, en los grupos de varones más jóvenes el %DFI estaba por debajo de ese valor (del 15% al 30%). Esto indica que gracias al SCSA también pudo demostrarse que existe una relación directa entre el %DFI y edad del paciente.

A parte de su relación con la fertilidad, el método SCSA es también una excelente herramienta para evaluar, por ejemplo, los daños en la cromatina espermática producidos por ciertas patologías o por agentes externos, como tóxicos ambientales. Por ejemplo, gracias a la técnica SCSA se mostró que la estructura de la cromatina espermática se ve comprometida en pacientes con leucocitospermia y varicocele (Rodríguez *et al.*, 2012), gripe y fiebre alta (Evenson *et al.*, 2000), y cáncer testicular no tratado (Kobayashi *et al.*, 2001). En cuanto a los estudios con tóxicos ambientales, realizados principalmente en roedores, la técnica ha permitido detectar defectos de DNA

en cuestión de horas a nivel molecular, que pueden observarse al microscopio entre 1 y 3 semanas después en forma de roturas cromosómicas en estado de metafase o a nivel embrionario presentándose como fetos muertos (Evenson *et al.*, 1993; Estop *et al.*, 1993).

Por lo tanto, el SCSA no es sólo capaz de detectar fragmentación en el DNA espermático y relacionarlo con la fertilidad, sino que también es capaz de cuantificar las anomalías de la cromatina espermática como resultado de factores epidemiológicos y enfermedades, tóxicos ambientales y hábitos de vida. Esto nos permite conocer qué factores afectan a la integridad de la cromatina y buscar soluciones a los problemas generados por los mismos. Además, la técnica SCSA es diferente a cualquier otra disponible porque todos los laboratorios e investigadores que actualmente utilizan esta prueba lo hacen de la misma forma y se adhieren estrictamente al protocolo desarrollado por Evenson en 1980. Esto permite un alto nivel de control de calidad, de forma que no se aceptarán aquellos estudios o análisis que no cumplan con los criterios establecidos. En este sentido, la técnica SCSA hace una contribución sólida al análisis seminal, que permite llevar a cabo estudios de carácter diagnóstico o con fines pronósticos. Por todo esto, la técnica SCSA se propone como la técnica más rápida y fiable del momento, y debe incluirse en el análisis de semen de forma rutinaria para completar la información obtenida de una muestra seminal y poder predecir esterilidad (Evenson *et al.*, 2002).

2. Hipótesis y objetivos

El presente trabajo se plantea con el fin de conocer a fondo la técnica SCSA (Sperm Chromatin Dispersion Assay), el procedimiento y protocolo a seguir para aplicarla y su utilidad en el análisis de muestras espermáticas de clínicas de reproducción asistida. Este estudio se centra en el análisis de los datos obtenidos en el Instituto INDEGSAL (Universidad de León), donde una gran cantidad de Clínicas españolas envían sus muestras para que el Dr. Felipe Martínez Pastor y sus colaboradores las analicen. Como hipótesis de trabajo, consideramos que la distribución de los distintos tipos de alteraciones de la cromatina detectadas en estos análisis podría parecerse a la reseñada en la bibliografía. Además, teniendo en cuenta estudios previos,

consideramos que la fragmentación espermática (parámetros derivados del DFI) debería ser independiente de la madurez de la cromatina (%HDS).

Los objetivos del trabajo fueron:

- Realizar los análisis mediante SCSA de las muestras enviadas por las clínicas de reproducción asistida.
- Determinar el impacto de distintos tipos de alteraciones en la cromatina espermática, tanto en las muestras analizadas durante la realización del trabajo experimental como en las que el grupo de investigación ha analizado durante el último año.
- Determinar la distribución de las alteraciones y las relaciones entre ellas.
- Determinar la significación de las alteraciones en las distintas muestras de acuerdo con la bibliografía, así como la prevalencia descrita y la encontrada en este estudio.

3. Materiales y métodos

3.1. Diseño experimental

En este trabajo, analizamos muestras seminales de humano provenientes de clínicas de reproducción asistida del territorio español, con el fin de detectar el grado de fragmentación del DNA y compactación de la cromatina de las mismas. En primer lugar, se envió el medio de mantenimiento (TNE) a las clínicas en cuestión y les indicamos cómo preparar las muestras, y cómo enviárnoslas. Tras la llegada de las muestras, se prepararon y analizaron aplicando la técnica SCSA siguiendo fielmente el protocolo indicado por Evenson y Jost (2000), utilizando citometría de flujo. Una vez obtenidos los datos, se analizaron para llevar a cabo un tratamiento estadístico de los mismos.

3.2. Preparación de la solución TNE

El TNE es un medio tamponado que se utiliza para diluir las muestras seminales antes de congelarlas, y en este caso, donde se conservan los espermatozoides hasta ser analizados. Para preparar la solución stock de TNE 10X, se pesaron en una balanza de precisión AE200 (Mettler-Toledo, Nueva York, EEUU) los reactivos necesarios para la solución, para obtener una concentración final de 100 mM Tris-HCl (Tris-HCl, Sigma T5941, Trizma hydrochloride), NaCl 1,5 mM (NaCl anhidro, Sigma S9625) y EDTA 10 mM (EDTA disódico dihidrato, Sigma E1644). Los reactivos pesados se diluyeron en una probeta de vidrio con agua milli-Q proporcionada por un dispensador de Milli-Q Synthesis A10 (Millipore Corporation, Bedford, EEUU), y se pasaron a un vaso de precipitados de vidrio, para posteriormente ser agitados para conseguir una correcta dilución, ayudados por un agitador magnético AGIMATIC-ED (JP SELECTA S.A., Laboratory equipment manufacturer, Barcelona, España). Una vez los reactivos estuvieron completamente disueltos, se ajustó el pH a 7,4 con la ayuda de un pHmetro SevenMulti FE20-FiveEasy™ pH (Mettler-Toledo S.A.E, Barcelona, España) una solución de NaOH (NaOH 2N, Sigma S5881) y una de HCl (HCl 2N, Sigma H1758). Finalmente, pasamos la solución de nuevo a una probeta de vidrio y enrasamos con agua milli-Q hasta el volumen deseado.

La solución stock de TNE 10X puede guardarse a 5 °C durante varias semanas, por lo que no es necesario prepararla para cada análisis. Si detectamos que se forman precipitados, calentamos y agitamos hasta que desaparecen, y podemos volver a utilizarlo.

3.3. Preparación de las muestras en clínica

A las clínicas que nos enviaron las muestras seminales, se envió refrigerada la solución stock TNE 10X previamente preparada, así como las directrices que debían seguir para la correcta preparación de las muestras.

Una vez recibieron la solución, realizaron una dilución 1/10 de la solución stock de TNE 10X, para obtener TNE 1X (por ejemplo, 100 µL TNE 10X en 900 µL de agua

milli-Q). Posteriormente, prepararon dos Eppendorf o criotubos por cada paciente (una muestra y su duplicado) y se rotularon con el código del paciente y la fecha. Con la ayuda de una pipeta automática P200 (VWR International Eurolab S.L., Barcelona, España) y sus correspondientes puntas pusieron 200 μ L de TNE 1X en cada Eppendorf o criotubo.

Posteriormente, y tras haber realizado el seminograma pertinente al paciente (conociendo su concentración, motilidad y morfología), se homogeneizó bien la muestra y se cogió el volumen necesario con una pipeta automática P200 para tener una concentración de $1-2 \times 10^6$ espermatozoides/mL (en total debe haber unos 200.000-400.000 espermatozoides por cada Eppendorf o criotubo). Este volumen se diluyó en los 200 μ L de TNE 1X, para después terminar cerrando correctamente el sistema tubo. Finalmente, se congelaron directamente las muestras preparadas en nitrógeno líquido. Se almacenaron en congeladores, preferiblemente a -80 °C, hasta su envío. En el caso de aquellas clínicas que no disponían de congeladores de esa temperatura, almacenaron las muestras en congeladores a -20 °C durante un máximo de 2 o 3 días.

Una vez prepararon las muestras, registraron todos los datos de las mismas en la hoja facilitada de registro, principalmente la concentración de cada dosis, o datos relevantes como muestras patológicas o potencialmente infecciosas. El envío de las muestras se realizó en cajas isoterma, con hielo seco cuando la clínica tenía acceso a éste. En aquellos casos en los que no era posible, se realizó con acumuladores de frío estándar, intentando evitar que las muestras se descongelasen.

3.4. Preparación de la muestra estándar

La muestra estándar es una muestra seminal que se utiliza para ajustar el citómetro antes de cada uso. Para su preparación se obtuvo una muestra de semen de cierta heterogeneidad de DFI. La muestra se preparó de la misma forma que cualquier otro tipo de muestra (ver apartado 3.3. “Preparación de las muestras en clínica”), pero se prepararon unas 100 dosis de la misma para poder ser utilizadas en varios análisis. Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido, y se almacenaron en congelador a -80 °C

(Sanyo VIP Series -86C Ultra-Low Temperature Freezer, SANYO North America Corporation, Panasonic USA) hasta su uso.

3.5. Preparación de solución detergente-ácida y solución de tinción

Para preparar la solución detergente-ácida, se pesaron en una balanza de precisión los reactivos necesarios para conseguir una concentración final de 150 mM NaCl, 0,1% Tritón X-100 (v/v) (Tritón X-100, Sigma T9284) y 80 mM HCl (HCl 2N, Sigma H3037). Los reactivos se disolvieron en agua milli-Q en una probeta de vidrio del volumen deseado. En este caso, no podemos aplicar el paso de agitación ya que el Tritón X-100 es un detergente y esta acción provocaría la producción de espuma. Una vez disueltos todos los componentes, se enrasó con agua ultrapura milli-Q hasta conseguir el volumen final deseado. Finalmente, se ajustó el pH a 1,2 con la ayuda del pHmetro.

Para la preparación de la solución de tinción, se preparó en primer lugar la solución stock de naranja de acridina (AO) (Acridine Orange, C.I. 46005, very high purity, 04539). Esta solución viene en polvo comercialmente, por lo que para su preparación fue necesario pesar en un vial de vidrio una cantidad entre 3 y 6 mg ayudados por una balanza de precisión. Posteriormente se pasó la cantidad pesada de AO a un frasco de vidrio y se añadió agua milli-Q hasta conseguir una concentración final de 1 mg/mL de AO.

Posteriormente, se preparó la solución de trabajo de AO. Para ello, se pesaron en la balanza de precisión los reactivos hasta una concentración final de NaCl 150 mM, Ácido cítrico 100 mM (Ácido cítrico anhidro, Sigma E6635), Na₂HPO₄ 200 mM (Na₂HPO₄ anhidro, Sigma S0876), y EDTA 1 mM. Éstos fueron diluidos en un vaso de precipitados con agua milli-Q y se mantuvieron en agitación ayudados por un agitador magnético hasta la completa disolución del EDTA. Una vez disuelto, se ajustó el pH a 6 con la ayuda del pHmetro.

Finalmente, se pasó la disolución a una probeta y se enrasó con agua milli-Q hasta el volumen deseado. La solución final se pasó a una botella específica para la

solución de tinción, y se añadió el volumen adecuado de la solución stock de AO (6 mL de solución stock de AO por cada litro de solución final). La botella fue cubierta completamente con papel de aluminio, para evitar que la luz incidiese sobre ella y el AO pudiese perder la fluorescencia.

El naranja de acridina es un compuesto mutagénico e irritante. Por ello, su manipulación fue llevada a cabo con guantes, gafas protectoras y mascarilla. Todo aquello que pudo resultar manchado durante la preparación de la solución se limpió con hipoclorito de sodio (lejía diluida 1/10 con agua destilada), y todo el material utilizado se reservó únicamente para el uso del AO (no puede ser usado para otras preparaciones).

3.6. Citómetro de flujo

El citómetro de flujo utilizado para llevar a cabo los análisis es el BD FACSCalibur™ Flow Cytometer (BD Biosciences, Becton-Dickinson, Immunochemistry Systems, San Jose, CA, USA) (*Figura 5*).



Figura 5: FACSCalibur™ Flow Cytometer conectado al ordenador con el software BD CellQuest™.

Contiene dos láseres, uno de argón refrigerado por aire que emite en azul (488 nm), y un láser de diodo que emite en rojo (~635 nm), separados espacialmente para

una mayor sensibilidad, una necesidad mínima de compensación, y una mayor flexibilidad en la selección de fluorocromos.

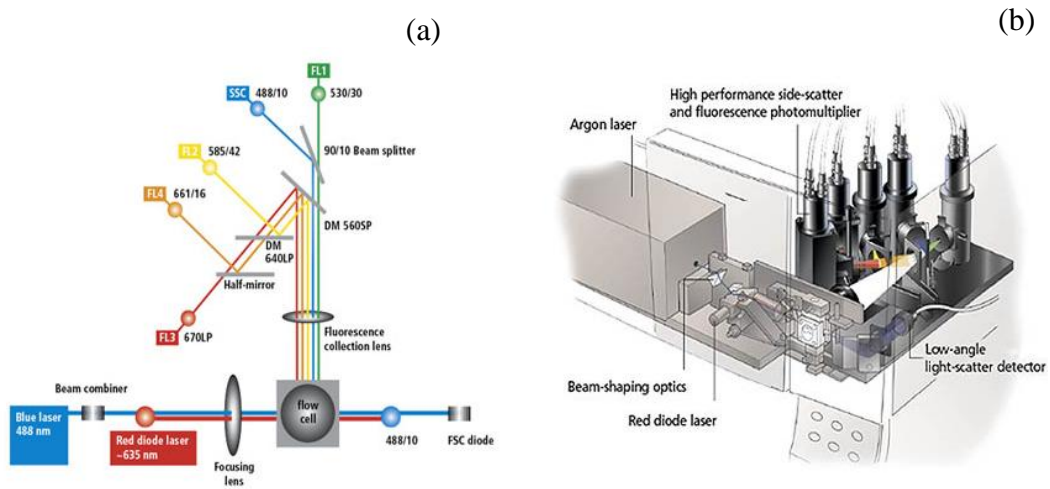


Figura 6: (a) Configuración óptica del citómetro. (b) Configuración interna del citómetro.

El citómetro se compone por varios fotodetectores y filtros para recoger la luz dispersada por la muestra (*Figura 6*). Entre ellos están:

-FSC-H: Forward Scatter. Es la luz dispersada frontalmente en ángulo cónico pequeño, coincidente con la luz incidente. Es proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión, por lo que nos da información acerca del tamaño del espermatozoide. Lleva un filtro de 488/10 nm, que recoge luz azul.

-SSC-H: Side Scatter. Es la luz dispersada lateralmente (90°) y es proporcional a la complejidad de la estructura del espermatozoide. Lleva un filtro de 488/10 nm, que capta emisión en azul.

-FL1, FL2, FL3 y FL4: son fotodetectores con sus correspondientes filtros para recoger la luz dispersada por la muestra en los distintos puntos del espectro (colores).

- FL1: filtro BP (Band Pass: paso por un rango de longitudes de onda) 530/28 nm, capta en verde.

- FL2: filtro BP 585/42 nm, capta en naranja.
- FL3: filtro LP (Long pass: deja pasar la luz por encima de la longitud de onda indicada) 670 nm, capta en rojo.
- FL4: filtro BP 661/16 nm, capta en rojo.

El naranja de acridina emite en rojo y verde (Evenson and Jost, 2000). Los datos correspondientes a la fluorescencia roja se captaron con el fotodetector FL3, y la fluorescencia verde se captó con el fotodetector FL1.

La información captada por estos fotodetectores pasa por unos fotomultiplicadores, para después ser convertida en una señal eléctrica que será leída e interpretada por el software de adquisición BD CellQuest™ (v. 1, BD Biosciences, Becton-Dickinson).

3.7. Puesta a punto del software de adquisición

El programa BD CellQuest™ (Figura 7) es el software utilizado para analizar los datos que nos proporciona el citómetro, y nos permite controlarlo (adquirir la muestra, definir los parámetros de los fotodetectores, etc.) y definir la información que queremos obtener de las muestras.

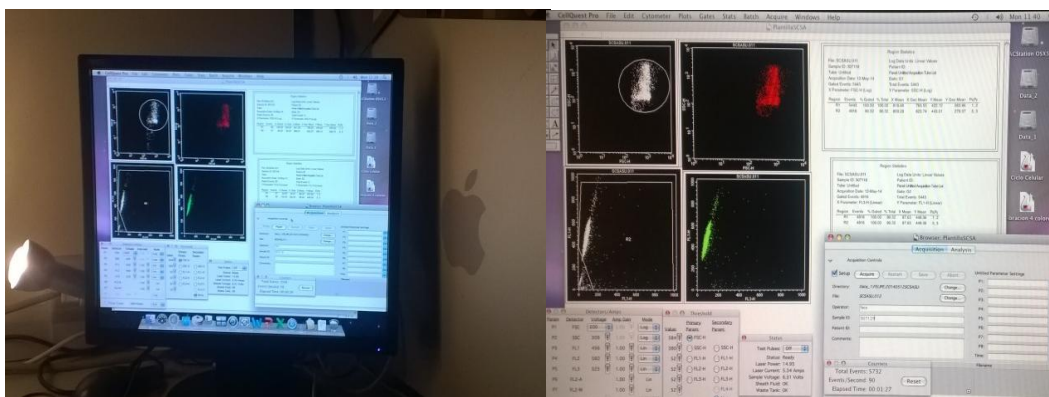


Figura 7: Software de adquisición BD CellQuest™.

Para el análisis de las muestras, creamos una plantilla de adquisición nueva en el programa. En primer lugar, con una nueva plantilla abierta, creamos una gráfica de dispersión puntos, con FL3-H en el eje x y FL1-H en el eje y. Utilizamos una escala

lineal en ambos ejes (0–1.023). Después, dibujamos una región dentro de la gráfica que excluyese las zonas donde apareciesen señales de debris, bacterias o células aglutinadas. Esta región excluye los valores extremos de cada fluorescencia (canales ≥ 1.000), el origen de coordenadas y la región situada a la izquierda de la población principal de células, y dentro de la misma debería aparecer la población principal de células. Posteriormente, configuramos el software para detener la adquisición al llegar a 5.000 eventos en la región anterior. Creamos un gráfico de puntos FSC-H vs. SSC-H (SSC-H: Side Scatter, FSC-H: Forward Scatter), para asegurarnos de que se adquieren correctamente los eventos correspondientes a espermatozoides. Además, ajustamos un punto de corte (Threshold) en la señal de FSC-H para eliminar ruido (eventos con $FSC-H \leq 350$).

Finalmente guardamos la plantilla para su uso en futuras mediciones. Antes de cada análisis revisamos la plantilla y el valor de corte, por si pudiese haber sido modificado.

3.8. Preparación del análisis y encendido del citómetro

Para la preparación del análisis, preparamos previamente todo el material y equipamiento necesarios. En primer lugar, pusimos hielo húmedo en una caja e introducimos las botellas con la solución detergente-ácida y la de tinción (es fundamental que las soluciones estén a 4 °C en todo momento). Después, ajustamos las pipetas P200 a 200 μ L, para pipetear las muestras, y la P1000 a 400 μ L, para la solución detergente-ácida (P200 y P1000, VWR International Eurolab S.L., Barcelona, España). Además, ajustamos una pipeta de 5 mL a 1,2 mL, para la solución de tinción.

Antes de comenzar el análisis, preparamos un tubo de citometría (FALCON[®], 12x75mm, poliestireno) con una solución para equilibrar el sistema de flujo, que contenía 400 μ L de solución detergente-ácida y 1,2 mL de solución de tinción. Finalmente, abrimos el BD CellQuest[™], y conectamos el citómetro. Para ello, en primer lugar quitamos el tubo con agua destilada que queda siempre tras el protocolo de apagado del citómetro. Después, comprobamos que el tanque de residuos estuviese

vacio y el tanque que contiene el líquido por el que pasan las células, el BD FACSFlow™ (BD Biosciences, Becton-Dickinson) estuviese lleno (3/4 del tanque) (Figura 8).



Figura 8: Tanques de desecho (derecha) y tanque de fluido FACSFlow (izquierda). A la derecha puede apreciarse la palanca para presurizar “VENT VALVE”.

Una vez comprobados los tanques, presurizamos el sistema pulsando “VENT VALVE”, y ponemos en marcha el citómetro. Después, eliminamos todo el aire del filtro salino, y pulsamos “PRIME” (Figura 9) hasta conseguir que no quedasen burbujas en la cámara de flujo. Posteriormente, pasamos agua destilada en modo “Run + HI” durante 5-10 minutos. A partir de aquí, el citómetro está preparado para comenzar el análisis. Es ahora cuando a través del programa BD CellQuest™ conectamos el citómetro con el software en la opción “Connect to cytometer”.

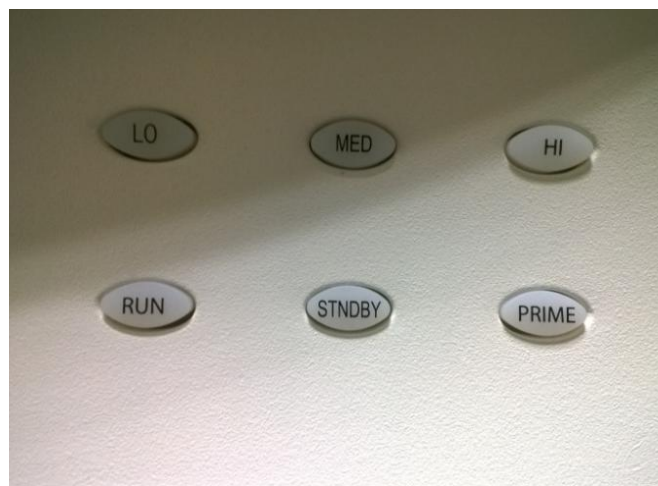


Figura 9: Botones de control del citómetro.

Una vez encendido, ajustamos la velocidad de flujo a un nivel bajo (“Run + LO”) para pasar el tampón de equilibrado durante 15 minutos antes de comenzar a pasar las muestras. Abrimos en el CellQuest™ la plantilla de adquisición creada anteriormente y generamos una carpeta donde guardamos los datos proporcionados por el citómetro. Es muy importante darle un nombre correcto a la carpeta generada, para que posteriormente podamos encontrarla con facilidad.

3.9. Ajuste de los parámetros del citómetro con la muestra estándar

Una vez pasados los 15 minutos con el tampón de equilibrado, pasamos a ajustar los parámetros del citómetro con la muestra estándar. En primer lugar, escogimos una dosis de muestra estándar del congelador de -80° C, y la dejamos en una caja con hielo durante 10 minutos. Después, descongelamos la dosis en un baño a 37 °C PRECISTERM 5L (JP SELECTA S.A., Laboratory equipment manufacturer, Barcelona, España) hasta comprobar que no hubiese restos de hielo.

Una vez descongelada, identificamos la muestra estándar en el CellQuest™ (Sample ID), y comenzamos su preparación. Para ello, colocamos un tubo de citometría en hielo y transferimos 200 µL de la muestra estándar al tubo. Después, añadimos 400 µL de la solución detergente-ácida y activamos el cronómetro. Exactamente a los 30 segundos, añadimos 1,2 mL de solución de tinción (este paso es absolutamente fundamental, descartando aquellos tubos que no cumpliesen el requisito de teñir a los 30 segundos exactos). Dejamos teñir la muestra dos minutos y quitamos el tampón de equilibrado para colocar la muestra estándar y analizarla. Comenzamos la adquisición en modo “Setup” (sin guardar los datos), y ajustamos la región de adquisición para excluir debris y no excluir células. Seguidamente ajustamos la velocidad de flujo del citómetro a 200–250 células/s (se trata de ajustar FL1-H para un valor medio de y de 130 ± 5 y FL3-H para un valor medio de x de 500 ± 5). Pasados unos 30 segundos, comenzamos a leer la muestra estándar sin el modo “Setup” para que guardase los datos. Cuando el citómetro analizó 5000 eventos, paró automáticamente y guardó los datos en la carpeta creada anteriormente. Dejamos pasando el tampón de equilibrado entre cada muestra.

3.10. Análisis de las muestras de semen

Con los parámetros del citómetro ajustados y todo el material preparado, comenzamos con el análisis de las muestras de semen. Sacamos las muestras a analizar del congelador a -80°C y las colocamos en una caja con hielo, dejándolas 10 minutos. Después, descongelamos las muestras y sus duplicados (descongelar muestra y duplicado a la vez para que estén exactamente a las mismas condiciones) en el baño a 37°C hasta comprobar que no quedasen restos de hielo. Colocamos las muestras y duplicados de nuevo en la caja con hielo, de forma ordenada. Pusimos un tubo de citometría por cada muestra y su duplicado en la caja con hielo y transferimos $200\ \mu\text{L}$ de cada muestra a su tubo correspondiente. Una vez preparadas las muestras en los tubos de citometría, comenzamos el análisis.

El análisis de las muestras se realizó de igual manera que la muestra estándar, utilizando los mismos tiempos y volúmenes de solución. Para cada muestra comprobamos que la velocidad de flujo estuviese entre 200–250 células/s. Como se ha comentado anteriormente, cuando el citómetro había analizado 5.000 eventos, paraba automáticamente y guardaba los datos.

El proceso de adquisición de 5000 células debería durar menos de 30 segundos a 200-250 células/s, sin embargo esto no siempre fue así. Si la velocidad era superior a 300 células/s, descartamos la muestra y, en caso de que la velocidad de flujo fuese muy baja (poca concentración, muestras muy diluidas), dejamos pasar la muestra un máximo de 3 minutos y paramos el análisis. Se guardó el número de eventos que habían sido analizados pasado en ese tiempo y se anotó en la hoja de registro. El duplicado se analizó de la misma forma, así como el resto de muestras.

Siempre que no hubiese muestra, dejamos pasando el tampón de equilibrado, y hacíamos lo mismo entre muestra y muestra. Es muy importante colocar el tubo del tampón de equilibrado al menos 30 segundos entre muestra y muestra, para evitar que queden restos del análisis anterior en el citómetro que puedan dar lugar a errores. Cuando se analizaba muestra, dejamos el tubo con tampón de equilibrado en la bandeja con hielo, manteniendo así su temperatura a $4\ ^{\circ}\text{C}$. Si había sospechas de desviación en

los parámetros del citómetro, repetimos el ajuste con la muestra estándar (debería hacerse cada 15 muestras).

3.11. Apagado del citómetro

Una vez terminamos el análisis, cerramos el programa CellQuest™ y nos aseguramos de que los datos habían sido guardados correctamente en la carpeta. Posteriormente, apagamos el ordenador y procedimos al protocolo de apagado del citómetro. El AO se adhiere a las superficies del sistema hidráulico del citómetro, por lo que es necesario dejar pasar unos mililitros de solución de hipoclorito de sodio (lejía diluida 1/10 con agua destilada) para limpiarlo correctamente. Colocamos la solución de hipoclorito y permitimos que aspirase ~1 mL con el brazo en posición lateral (aspira muy rápido, más o menos la mitad del contenido del tubo con hipoclorito). Después, colocamos el brazo en posición de adquisición y dejamos que aspirase durante 5-10 minutos en modo “Run” y flujo alto (HI). Después, dejamos pasar agua destilada durante otros 10 minutos. Este tubo con agua destilada se deja hasta que el citómetro vuelva a utilizarse.

Finalmente, pulsamos “STANDBY”, despresurizamos quitando la válvula “VENT VALVE” y apagamos el citómetro.

3.12. Análisis de los archivos de citometría

Los datos proporcionados por el citómetro se guardaron como archivos FCS, para poder ser leídos por el software de análisis. El estudio de los datos se hizo con el entorno estadístico R (versión 3.1.0, The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.rproject.org>), utilizando el paquete FlowCore para leer y trabajar con archivos FCS. En caso de ser muestras muy patológicas, o especialmente complicadas de analizar, utilizamos el programa Weasel (v.3.0.1), que permite comprobar que no haya presencia de debris, bacterias, células aglutinadas, y eliminarlos si se encuentran, utilizando una plantilla de análisis similar a la plantilla de adquisición.

En el histograma que representa el DFI y la fluorescencia total, debemos distinguir una población principal, que se sitúa por debajo de un 25% de fragmentación (DFI). Los puntos de corte para determinar el %DFI son fijos y se obtuvieron del protocolo de Evenson and Jost, (2000). Tras calcular la fluorescencia total (roja + verde) y el valor DFI de cada espermatozoide [$\text{Rojo}/\text{Total} \times 100$], se dibujó un gráfico de puntos fluorescencia total vs. DFI y un histograma de DFI. En el histograma debemos distinguir un pico principal bien definido y una región a su derecha con uno o más picos (%DFI). El punto de corte para definir las células con DFI medio o alto se establece justo a la derecha del pico principal, típicamente entre 20–25% DFI (*Figura 10*), y se utiliza para analizar todas las muestras. El punto de corte entre %DFIm (Moderate) y %DFIh (High) se establece 50 puntos más arriba del corte para %DFI. Evenson *et al.*, (2002), aplican el umbral entre el hDFI y el mDFI en un 75%. El %HDS (High DNA Stainability) es el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia verde por encima del canal 600, y el punto de corte se sitúa en un 60% de la fluorescencia verde recogida (Evenson *et al.*, 1999).

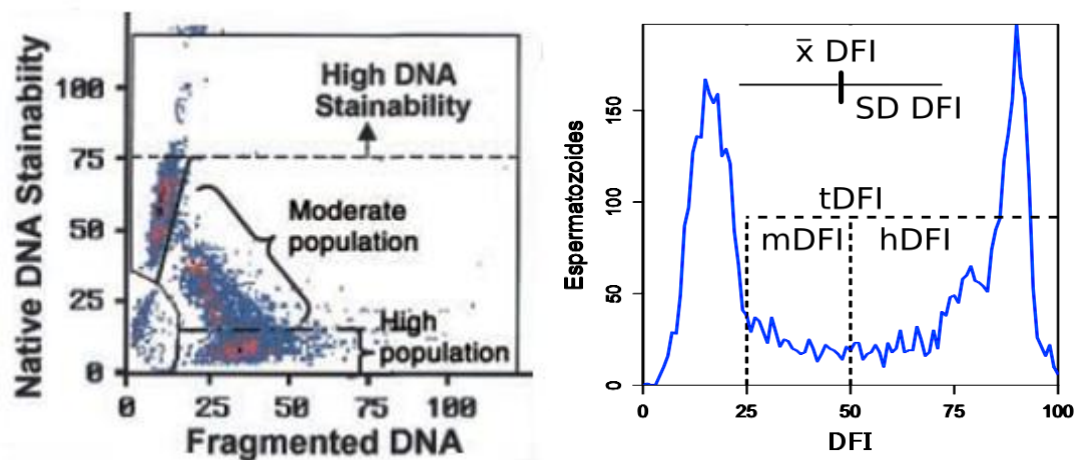


Figura 10: Histogramas que representan el DFI de cada evento y los estadísticos derivados.

Posteriormente, se realizaron los cálculos para cada muestra, obteniendo los parámetros: \bar{x} -DFI (media del DFI), SD-DFI (desviación estándar del DFI), %DFIm (porcentaje de espermatozoides con fragmentación moderada), %DFIh (porcentaje de espermatozoides con alta fragmentación), %DFI (porcentaje de fragmentación global) y %HDS (High DNA Stainability, porcentaje de espermatozoides con la cromatina descondensada) (Evenson and Jost, 2000).

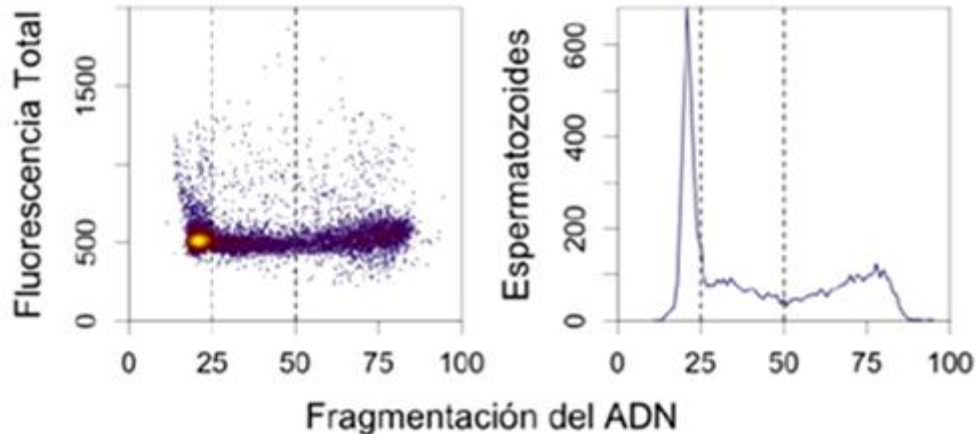
Los resultados obtenidos tras el análisis con el R y Weasel se formalizaron en un documento que se envió a las clínicas, con toda la información obtenida sobre las muestras de los pacientes y el diagnóstico obtenido de su estudio. El documento enviado de forma rutinaria presenta un aspecto similar al mostrado en la *Figura 11*. En el informe facilitado a las clínicas aparecen los histogramas obtenidos correspondientes a la muestra y el replicado de la misma, la media del DFI, la desviación estándar del DFI (SD-DFI), los porcentajes de fragmentación moderado y alto, el porcentaje de fragmentación total y la medida del %HDS (inmadurez o grado de desnaturalización de la cromatina). También se muestra la media y desviación estándar entre las dos réplicas. Finalmente, se les facilita el significado de cada uno de los parámetros analizados, y un diagnóstico o evaluación final, que en algunos casos puede ir seguido de alguna recomendación.

3.13. Análisis estadístico

Realizamos los análisis estadísticos con el entorno R (versión 3.1.0, The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.rproject.org>) y su paquete Rcmdr. Los datos analizados fueron los resultados obtenidos del análisis por SCSA de muestras de clínicas de reproducción asistida españolas desde diciembre de 2012 hasta mayo de 2014. Se analizaron un total de 643 muestras. Los datos obtenidos del estudio se pasaron a un archivo de Excel, y se creó una tabla dinámica con los mismos para poder calcular los promedios de cada parámetro (x-DFI, SD-DFI, %DFIm, %DFIh, %DFI y %HDS). En el entorno R se calcularon medias, desviaciones estándar, cuartiles, coeficientes de variación, máximos y mínimos, frecuencias, y distribuciones para cada uno de los parámetros. Se analizaron por separado las poblaciones obtenidas del estudio del %DFI y %HDS y se generaron histogramas y gráficos de cajas para visualizar mejor los resultados obtenidos. Finalmente, se aplicó la prueba de χ^2 para estudiar la posible asociación entre el %DFI y %HDS.

Informe de análisis del estado de la cromatina espermática (análisis mediante citometría de flujo)

Muestra	Clinica	Fecha de recogida
Fecha de recepción	Fecha de análisis	Fecha de envío de resultados
Apellidos	Nombre	Edad



Réplica	Células analizadas	Fragmentación del ADN					
		Media	Dev. Est.	Moderada (%)	Alta (%)	Total (%)	Inmadurez (%)
1	7079	42,05	22,55	24,09	36,01	60,1	1,27
2	7358	42,31	22,35	23,27	37,69	60,96	1,05
media		42,18	22,45	23,68	36,85	60,53	1,16
dev. est.		0,18	0,14	0,58	1,19	0,61	0,16

Resultados de fragmentación del ADN (total) superiores al 27% están asociados con una disminución importante de la fertilidad. Resultados entre el 10% y 27% indican unos niveles aceptables de fragmentación, aunque podrían estar asociados con una menor probabilidad para concebir.

Un nivel de inmadurez espermática superior al 15% puede estar asociado a una menor probabilidad de concebir y a un menor éxito en FIV vs. ICSI.

Evaluación final: Estado de la cromatina espermática malo, con nivel de fragmentación total muy superior al 27%. Probable afectación de la fertilidad. Sería recomendable un reanálisis en unos meses, posiblemente tras medidas correctivas. El grado de inmadurez de los espermatozoides es bajo.

En León, a 3 de julio de 2013

Revisado y aprobado:

INDEGSAL, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071 León (Spain)
e-mail: felipe.martinez@unileon.es Tfn.: 987291000-5679

Figura 11: Informe entregado a las clínicas con los resultados del análisis SCSA.

4. Resultados

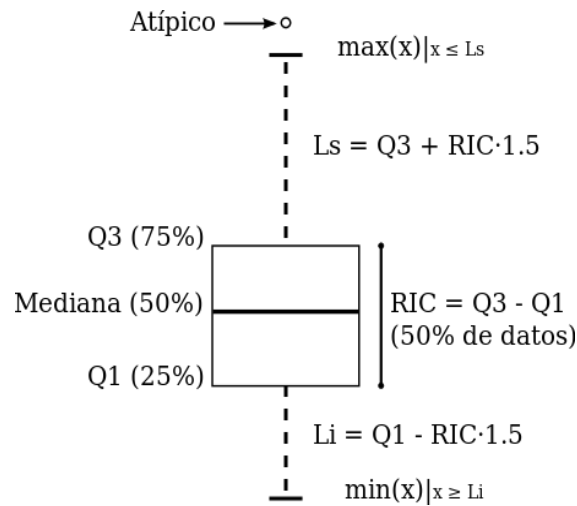
4.1. Análisis general de todo el conjunto de muestras

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio general de todas las muestras, es decir, de las 643 muestras recibidas de las clínicas de reproducción asistida. Se calcularon los valores correspondientes al primer cuartil, mediana, media, tercer cuartil, extremos superior e inferior, y valores atípicos para cada uno de los parámetros obtenidos del análisis por SCSA, para posteriormente ser representados en forma de Boxplot (*Figura 12 (a)*). Los resultados de este estudio se muestran en la *Figura 12 (b)*. Como se puede observar, el rango de los valores de fragmentación total (%DFI) en las muestras analizadas es muy amplio.

En las *Figuras 13 y 14* mostramos ejemplos de muestras con distintos tipos de alteraciones. Para un porcentaje de fragmentación bajo, considerado así cuando el %DFI < 15%, el patrón mostrado sería parecido al de la *Figura 13 (a)*. El ejemplo se corresponde con un porcentaje de fragmentación de inferior a un 1%, y como podemos observar, la totalidad de la población se encuentra por debajo del rango patológico. Para una muestra dentro del rango aceptable pero con cierto nivel de fragmentación, el gráfico cambia notablemente. En la *Figura 13 (b)*, correspondiente a un porcentaje de un 21,3% de %DFI, la población principal está claramente más dispersa en comparación con la *Figura 13 (a)*, y la mayor parte de la población de espermatozoides se sitúa por debajo del punto de corte patológico. Finalmente, en la *Figura 13 (c)* observamos una muestra con un porcentaje de fragmentación total de un 92,8%, prácticamente sin población principal, y además con un alto porcentaje de %DFI_h (59,6%).

En el caso del %HDS, también pueden presentarse grandes variaciones. Se muestran tres ejemplos de %HDS, uno bajo, intermedio y uno que se sitúa por encima del punto de corte para considerarlo como patológico. En la *Figura 14(a)* podemos ver el histograma de la muestra con un porcentaje muy bajo de %HDS, de un 1,8%, y en la *Figura 14 (b) y 14 (c)* el resultado mostrado por muestras con un porcentaje intermedio (6,9%) y alto de %HDS (16,5%) respectivamente.

(a)



(b)

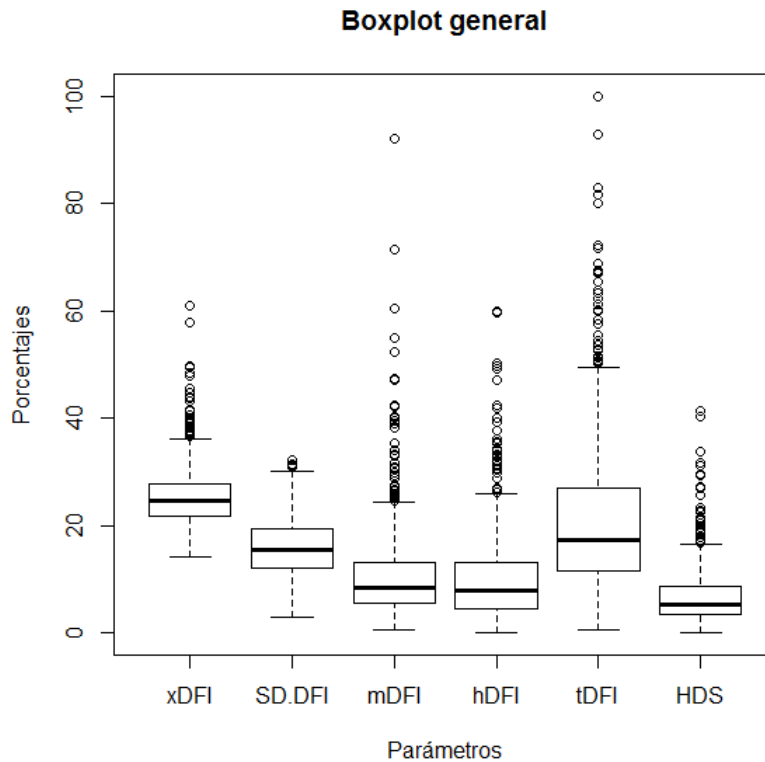


Figura 12: (a) Esquema descriptivo donde puede observarse a qué corresponde cada punto de un Boxplot. En este se representa el primer cuartil, mediana, media, tercer cuartil, extremos superior e inferior, y valores atípicos. RIC: Rango intercuartil, $\max(x)$: máximo dentro de los valores de $1,5 \times RIC$, $\min(x)$: mínimo dentro de los valores de $1,5 \times RIC$, Q1 y Q3: primer cuartil y tercer cuartil respectivamente. (b) Boxplot o diagrama de cajas que indica los valores obtenidos del cálculo del primer cuartil, mediana, media, tercer cuartil, extremos superior e inferior, y valores atípicos (círculos) para xDFI (x-DFI, media del DFI), SD.DFI (SD-DFI, desviación estándar del DFI), mDFI (%DFIm, porcentaje de DFI moderado), hDFI (%DFIh, porcentaje de DFI alto), tDFI (%DFI, DFI total), y HDS (%HDS, High DNA Stainability).

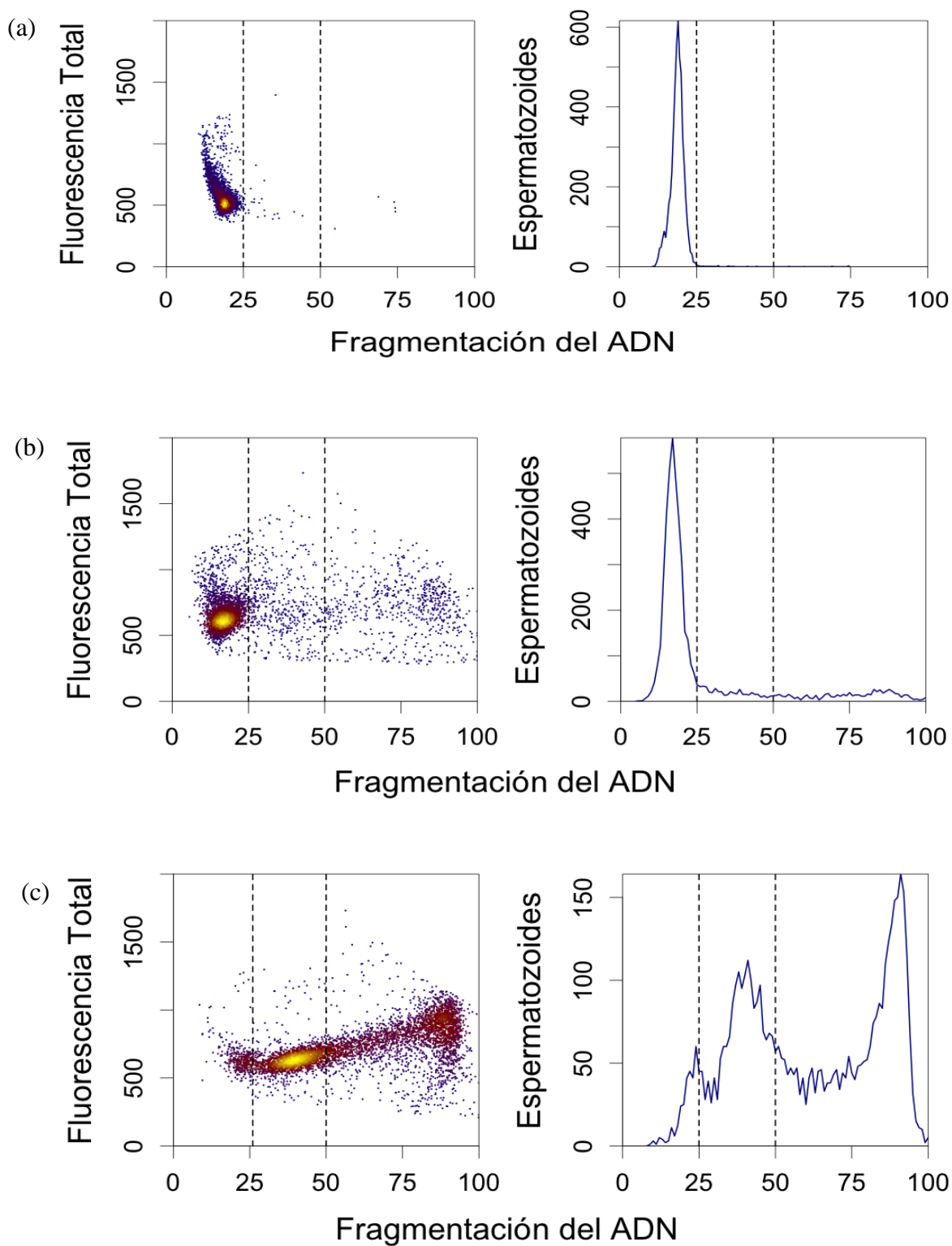


Figura 13: Histogramas que muestran el %DFI. (a) Muestra con un %DFI muy bajo (mínimo). (b) Muestra con un %DFI intermedio. (c) Muestra con un porcentaje muy alto de fragmentación.

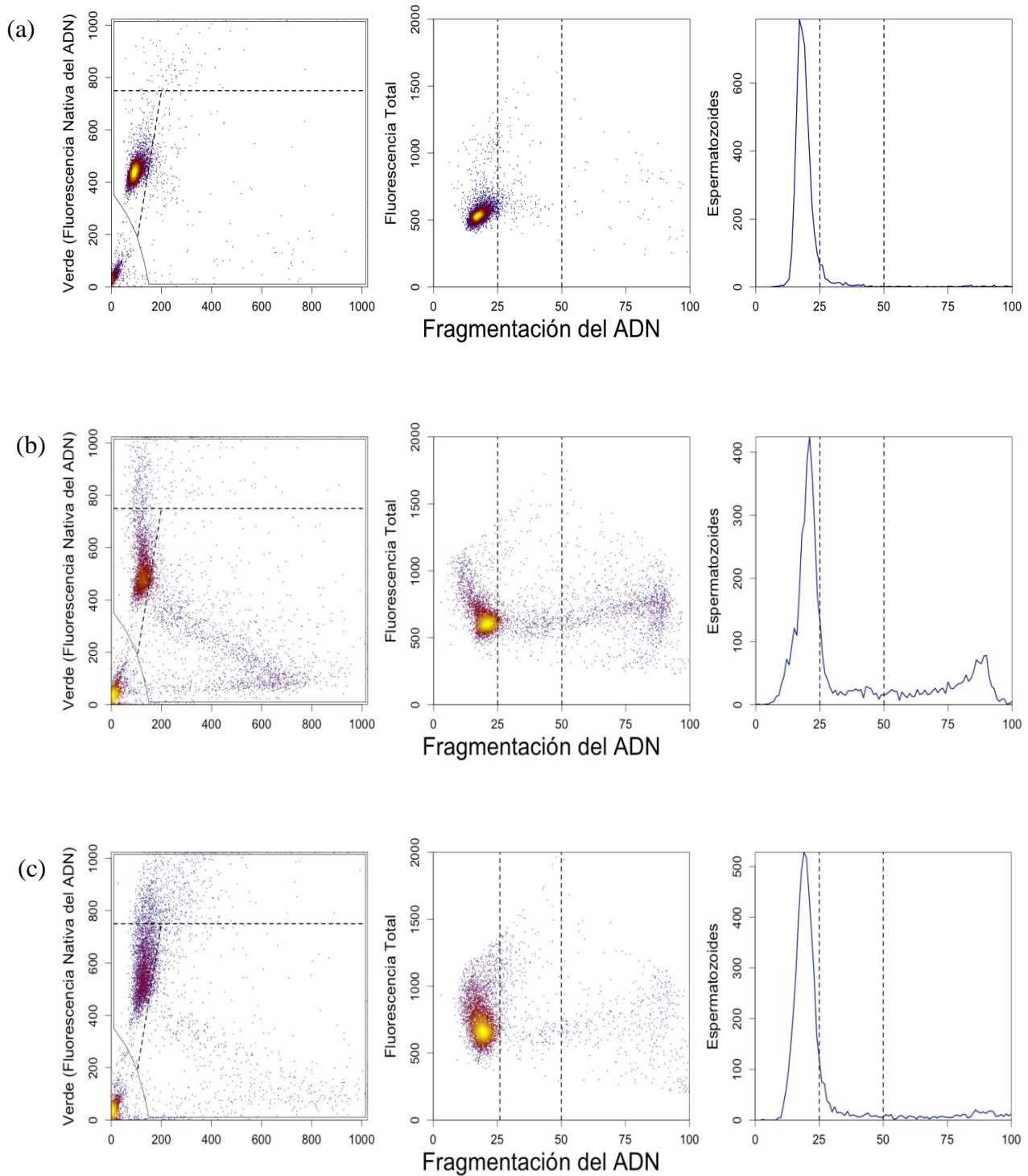


Figura 14: Histogramas y citogramas que muestran el %HDS y el %DFI. (a) Muestra con un porcentaje muy bajo de %HDS (grado de condensación de la cromatina) y un porcentaje bajo de fragmentación. (b) Muestra con un porcentaje intermedio de %HDS. (c) Muestra con un porcentaje alto de %HDS, superior al patológico (considerado así por encima de un 15%).

4.2. Estudio general de los análisis con más de 1000 eventos

El estudio por SCSA está configurado para analizar 5000 espermatozoides por muestra, sin embargo, no siempre es posible analizar este número de eventos. En casos de pacientes con patologías como oligozoospermia u oligoastenoteratozoospermia, la concentración espermática del paciente es muy baja, y el número de eventos analizados en el tiempo estipulado puede ser inferior a 5000. En algunos casos no llega a 1000 espermatozoides. Aunque estos análisis siguen teniendo utilidad clínica, para los propósitos de este trabajo, realizamos un filtrado de los datos para mostrar sólo aquellos que estuviesen por encima de 1000 eventos analizados por SCSA en el tiempo máximo de 3 minutos. Este filtrado evita resultados con gran influencia de variaciones por azar, que pueden llevarnos a error. El resto de estudios se realizaron con este nuevo conjunto de muestras.

La *Figura 15* muestra la distribución de las variables con estos datos filtrados, para el mínimo, primer cuartil, mediana, media, tercer cuartil, máximo y valores atípicos de los parámetros analizados, una vez filtrado el conjunto de datos para un número de eventos superior a 1000.

4.3. Clasificación y estudio de los datos para los parámetros derivados del SCSA: *x-DFI*, *SD-DFI*, *%DFI* y *%HDS*

En primer lugar, se realizó un estudio de las frecuencias del *x-DFI*, *%DFI*, el *SD-DFI*, y el *HDS* y de su correspondiente distribución para poder visualizar más fácilmente los resultados. Como muestra la *Figura 16*, la mayor parte de las muestras presentan un porcentaje de fragmentación para el *x-DFI* de un 20-25%. La distribución muestra una serie de valores atípicos, que se corresponden con los valores máximos de fragmentación en el conjunto de datos. En el caso del *%DFI* la mayoría de las muestras mostraron un porcentaje de fragmentación intermedio-bajo, pudiendo observarse lo mismo en el diagrama de cajas (*Figura 17*). Del mismo modo, se pueden observar una serie de valores atípicos, habiendo detectado una muestra con un *%DFI* de un 100%.

En cuanto al *SD-DFI*, el valor medio encontrado fue de 15%, con gran variabilidad entre muestras, como puede observarse en el histograma (*Figura 18*). El

mismo estudio se llevó a cabo para el parámetro %HDS (*Figura 19*). En este caso se obtuvo una clara mayoría de muestras con un porcentaje muy bajo de %HDS, y prácticamente la totalidad de ellas se situó por debajo del punto de corte del 15% de %HDS.

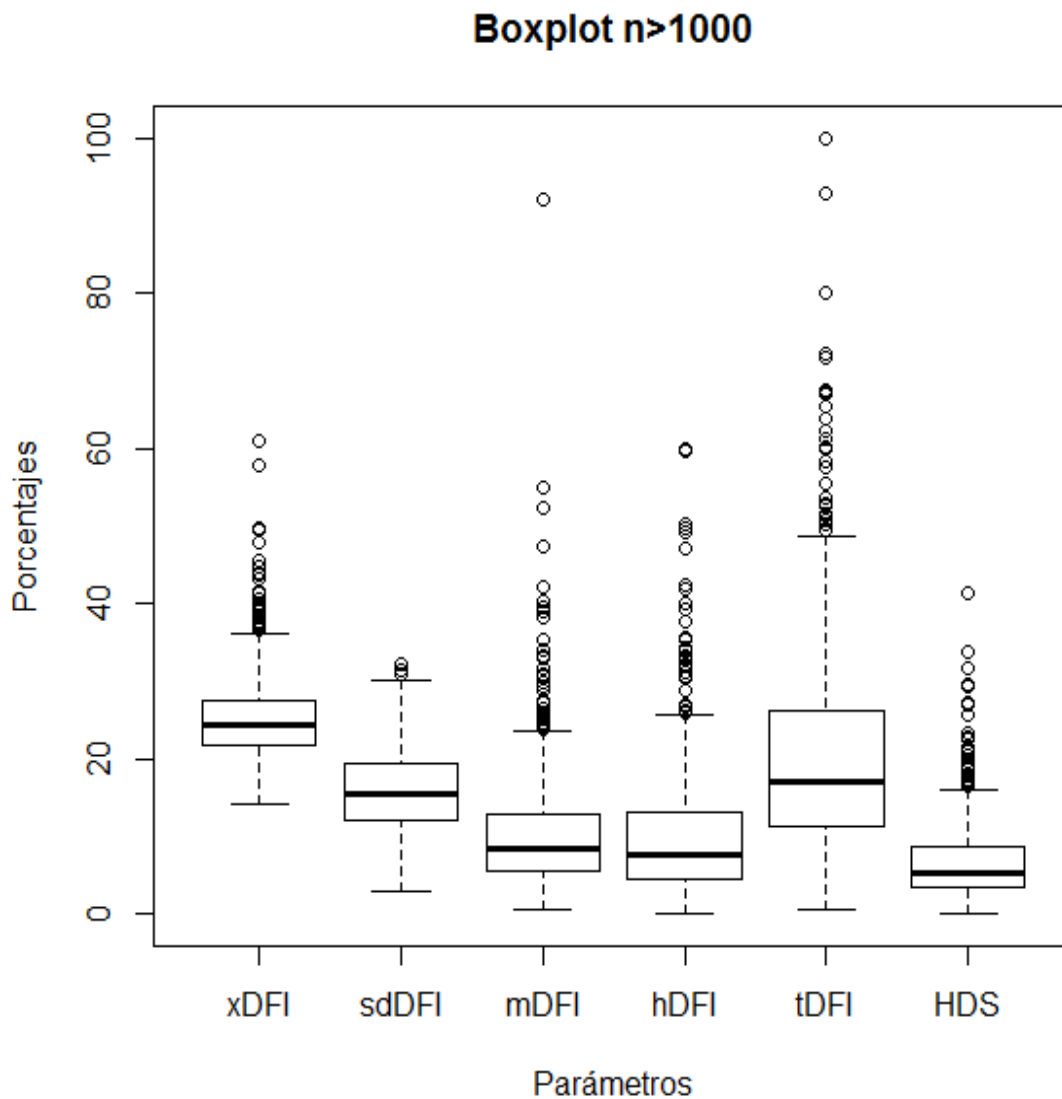


Figura 15: Boxplot que indica los valores obtenidos del cálculo del primer cuartil, mediana, media, tercer cuartil, extremos superior e inferior y valores atípicos para xDFI (x-DFI, media del DFI), sdDFI (SD-DFI, desviación estándar del DFI), mDFI (%DFIm, porcentaje de DFI moderado), hDFI (%DFIh, porcentaje de DFI alto), tDFI (%DFI, DFI total), y HDS (%HDS, High DNA Stainability) tras eliminar las muestras con menos de 1000 espermatozoides analizados.

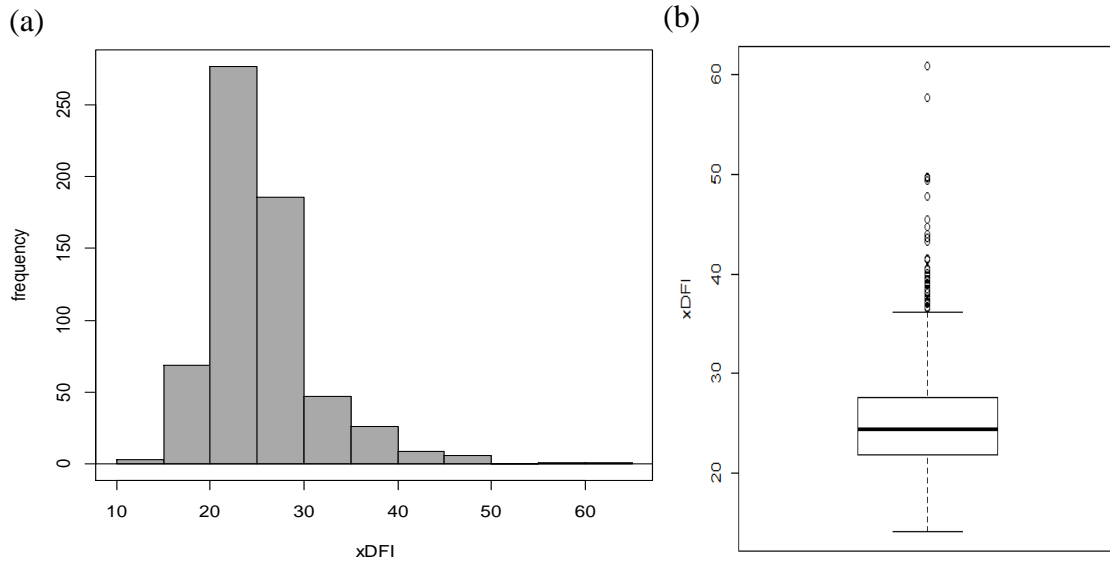


Figura 16: (a) Histograma de frecuencias de x-DFI (xDFI). (b): Bloxplot para x-DFI que muestra la proporción de muestras para cada porcentaje de x-DFI, la distribución de las medias y los valores atípicos (círculos).

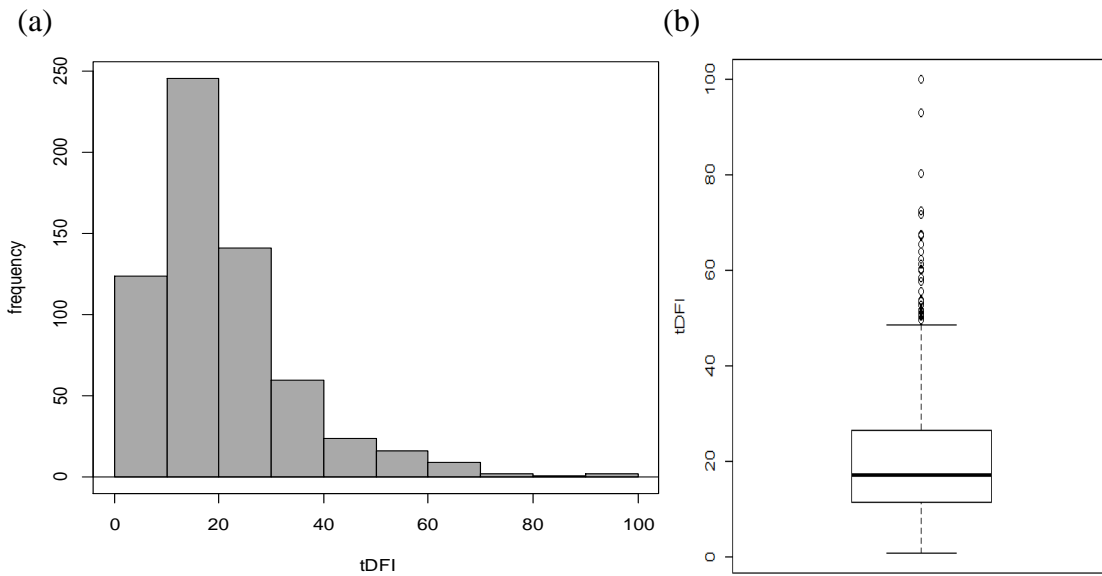


Figura 17: (a) Histograma de frecuencias de %DFI (tDFI). (b): Boxplot para %DFI (tDFI) que muestra la proporción de muestras para cada porcentaje de %DFI, las posibles variaciones y los valores atípicos.

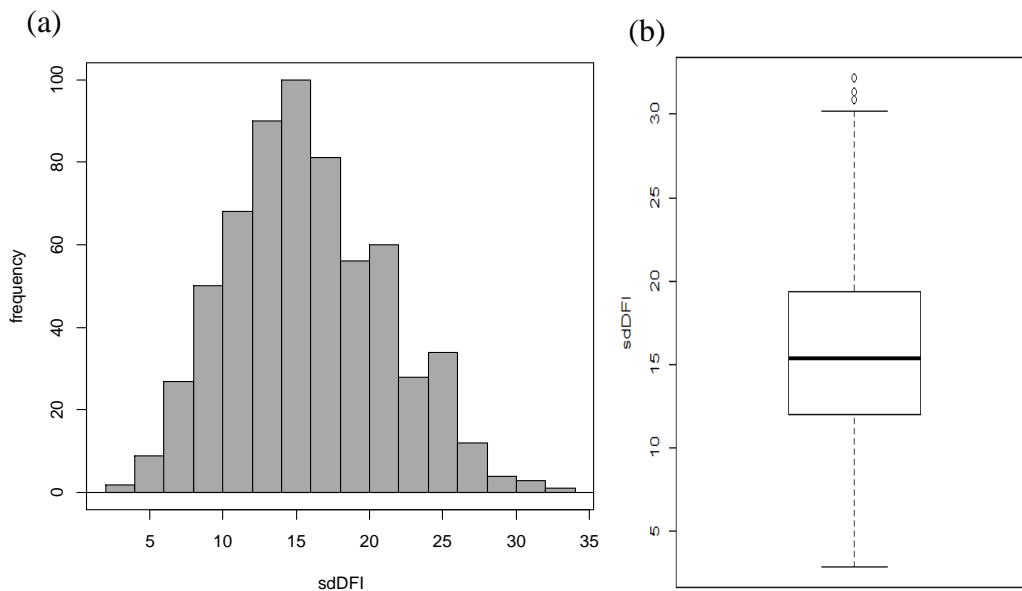


Figura 18: Histograma de SD-DFI (sdDFI) que muestra la frecuencia para cada valor de desviación estándar. (b): Boxplot para SD-DFI que muestra la proporción de muestras para cada porcentaje de SD-DFI, las posibles variaciones y los valores atípicos.

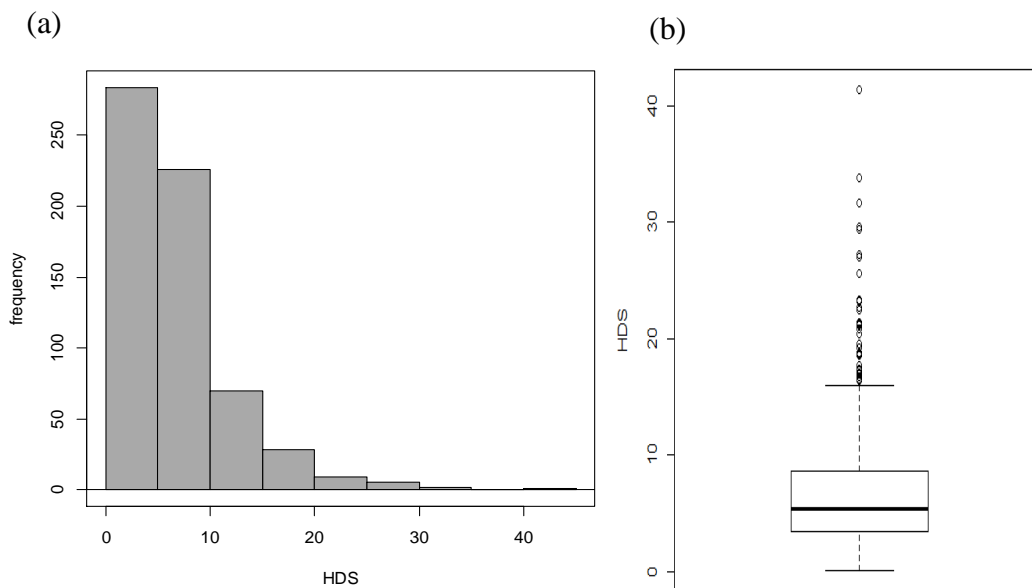


Figura 19: (a) Histograma de frecuencias de %HDS (HDS). (b): Boxplot para %HDS (HDS) que muestra la proporción de muestras para cada porcentaje de %HDS, las posibles variaciones y los valores atípicos.

Tras el estudio general de las frecuencias y distribuciones, se estudiaron las muestras con el fin de comprobar el porcentaje de las mismas que se correspondía con un alto porcentaje de fragmentación, un porcentaje intermedio y uno bajo. Los puntos de corte para cada clasificación se tomaron del trabajo de Evenson y Wixon, (2006).

También se estudió el parámetro %HDS, tomando como punto de corte un 15%. Como se puede observar en la *Tabla 3*, existen tres poblaciones claramente definidas de %DFI, obteniéndose un porcentaje inferior de pacientes con alta fragmentación (aproximadamente un 10% inferior) que aquellos con una fragmentación intermedia. En cuanto al %HDS, que nos da información sobre el grado de desnaturalización de la cromatina, el porcentaje de pacientes con %HDS considerado alto (>15%) fue muy bajo (únicamente un 7,2% del conjunto de muestras). Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 20* para una mejor visualización global.

Tabla 3: Clasificación del conjunto de datos para %DFI alto (>27%), intermedio (15-27%) y bajo (<15%); y %HDS alto (>15%) y bajo (<15%). Los resultados se muestran en número de muestras del total y en porcentaje.

Tipo de conteo	%DFI			%HDS	
	<15%	15-27%	>27%	<15%	>15%
Número	257	220	148	580	45
Porcentaje (%)	41,1	35,2	23,7	92,8	7,2

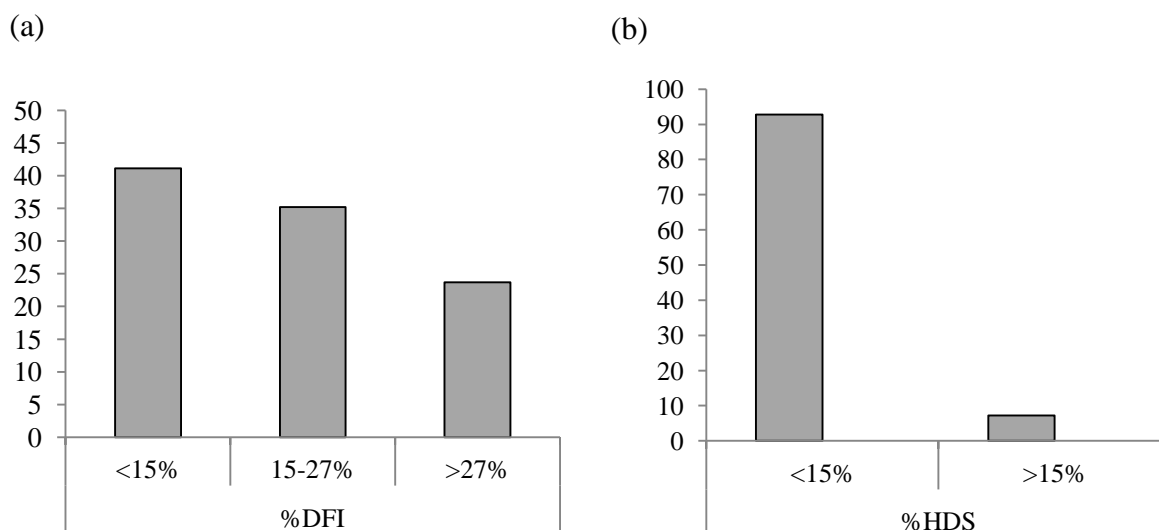


Figura 20: (a) Gráfico de barras que muestra la clasificación de muestras para el %DFI. Las barras muestran los porcentajes de cada grupo. (b) Gráfico de barras que muestra la clasificación de muestras para el %HDS.

4.4. Análisis de los datos en las categorías de %DFI

Gracias al estudio del parámetro %DFI, podemos distinguir tres poblaciones dentro del conjunto de datos: aquellas muestras con un porcentaje de fragmentación inferior a un 15%, muestras con un porcentaje intermedio entre el 15% y el 27% y pacientes con muestras seminales cuya fragmentación es superior al 27%. En primer lugar se estudió la distribución del %DFI en cada una de las poblaciones (*Figura 21*). Posteriormente, se realizó un análisis de cada parámetro en cada una de las categorías de %DFI. En las *Figuras 22, 23 y 24* se representan los valores de x-DFI y SD-DFI, %DFIm y %DFIh, y %HDS respectivamente. También se estudiaron la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada una de las categorías (*Tabla 4*).

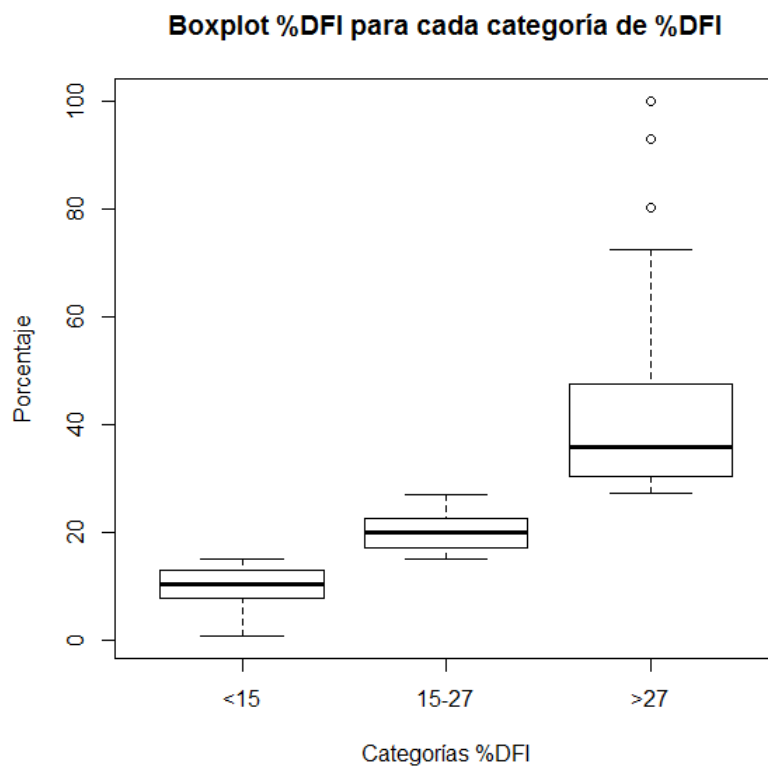
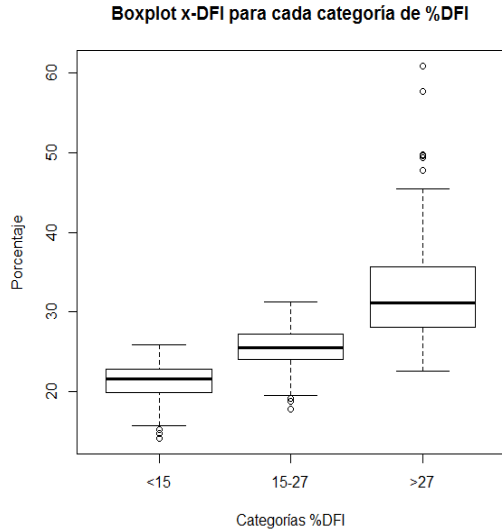


Figura 21: Boxplot que muestra la distribución del %DFI en los subgrupos definidos para este parámetro: bajo (%DFI<15%, <15), intermedio (%DFI 15-27%, 15-27) y alto (%DFI>27%, >27).

(a)



(b)

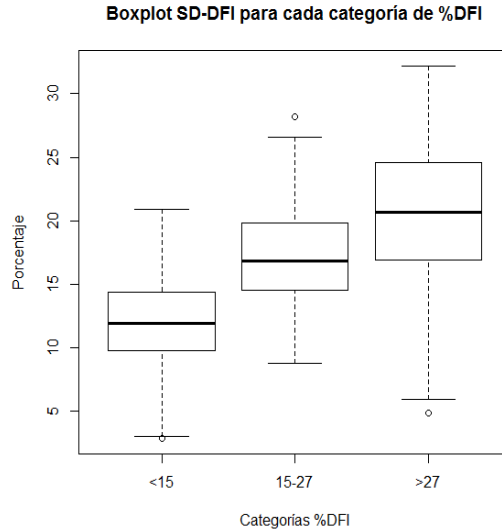
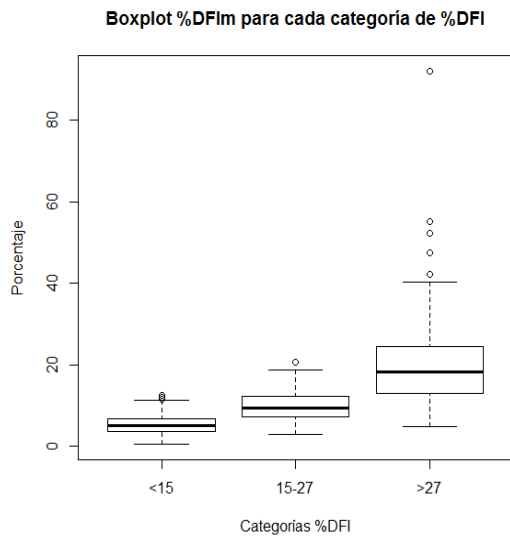


Figura 22: (a) Boxplot que muestra la distribución para x-DFI (media de fragmentación) para cada categoría de %DFI (bajo (%DFI<15%, <15), intermedio (%DFI 15-27%, 15-27) y alto (%DFI>27%, >27). (b) Boxplot para SD-DFI (desviación estándar del DFI) en cada categoría de %DFI.

(a)



(b)

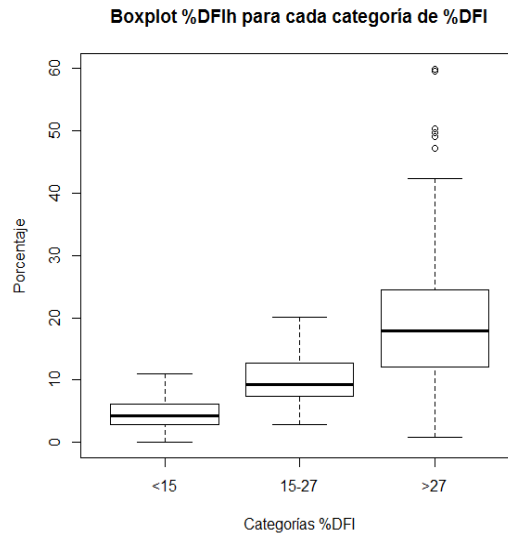


Figura 23: (a) Boxplot que muestra la distribución para %DFIm (porcentaje de fragmentación moderada) en cada categoría de %DFI (bajo (%DFI<15%, <15), intermedio (%DFI 15-27%, 15-27) y alto (%DFI>27%, >27). (b) Boxplot para %DFIh (porcentaje de fragmentación alta) en cada categoría de %DFI.

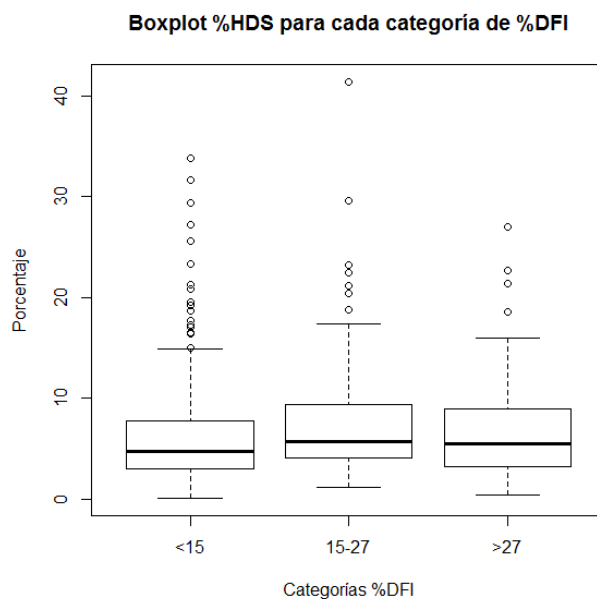


Figura 24: Boxplot que indica los valores obtenidos del cálculo del mínimo, primer cuartil, mediana, media, tercer cuartil, máximo y valores atípicos para %HDS (High DNA Stainability), para cada categoría de %DFI (bajo (%DFI<15%, <15), intermedio (%DFI 15-27%, 15-27) y alto (%DFI>27%, >27).

Tabla 4: Valores correspondientes a la media \pm desviación estándar (SD), y coeficiente de variación (CV%) para los parámetros x-DFI (media del DFI), SD-DFI (desviación estándar del DFI), %DFIm (porcentaje de DFI moderado), %DFIh (porcentaje de DFI alto), %DFI (DFI total), y %HDS (High DNA Stainability), en el conjunto de datos para %DFI<15%, %DFI 15-27% y %DFI>27%.

	<u>%DFI<15%</u>		<u>%DFI 15-27%</u>		<u>%DFI>27%</u>	
Parámetro	media \pm SD	CV%	media \pm SD	CV%	media \pm SD	CV%
x-DFI	21,2 \pm 2,3	0,1	25,5 \pm 2,3	0,1	32,6 \pm 6,5	0,2
SD-DFI	11,9 \pm 3,5	0,3	17,1 \pm 3,8	0,2	20,4 \pm 5,2	0,2
%DFIm	5,4 \pm 2,4	0,4	10 \pm 3,4	0,3	20,4 \pm 10,9	0,5
%DFIh	4,5 \pm 2,2	0,5	10 \pm 3,7	0,3	19,8 \pm 11,1	0,5
%DFI	9,9 \pm 3,2	0,3	20 \pm 3,3	0,1	40,2 \pm 13,2	0,3
%HDS	6,5 \pm 5,4	0,8	7,4 \pm 5,2	0,7	6,5 \pm 4,4	0,7

Además, realizamos un estudio con el fin de estudiar el impacto de la alta fragmentación (%DFIh) en cada categoría de %DFI. Este estudio se realizó porque el impacto de la fragmentación total (%DFI) podría estar modulado de acuerdo al impacto de la alta fragmentación (%DFIh). Se considero alto un %DFIh por encima de un 15%.

En primer lugar, se analizó de forma general el parámetro %DFIh en cada una de las categorías de %DFI. En el grupo de pacientes con %DFI<15% no se encontró ninguna muestra con un %DFIh>15%, el 100% de las muestras dentro de esa categoría presentó un %DFIh<15% (*Figura 25 (a)*). En el grupo de muestras con un %DFI intermedio, entre 15-27% de %DFI, algunas muestras mostraron un porcentaje de %DFIh superior al punto de corte, con un máximo de un 20% de %DFIh. Los resultados se muestran en la *Figura 25 (b)*. Dentro del grupo de muestras con %DFI superior al 27% se obtuvieron los resultados mostrados en la *Figura 25 (c)*. Una gran proporción de muestras mostraron un porcentaje de %DFIh superior al punto de corte, alcanzando un máximo de un 60%. Posteriormente, se analizó cada categoría creada para el %DFIh (%DFIh<15% y %DFIh>15%) en cada una de las poblaciones de %DFI (*Tabla 5*). En el grupo de datos con %DFI 15-27%, un 10,4% de las muestras presentaron un %DFIh>15%, mientras que, en el grupo de datos con %DFI>27%, un 65,5% de las muestras mostraron un %DFIh>15%.

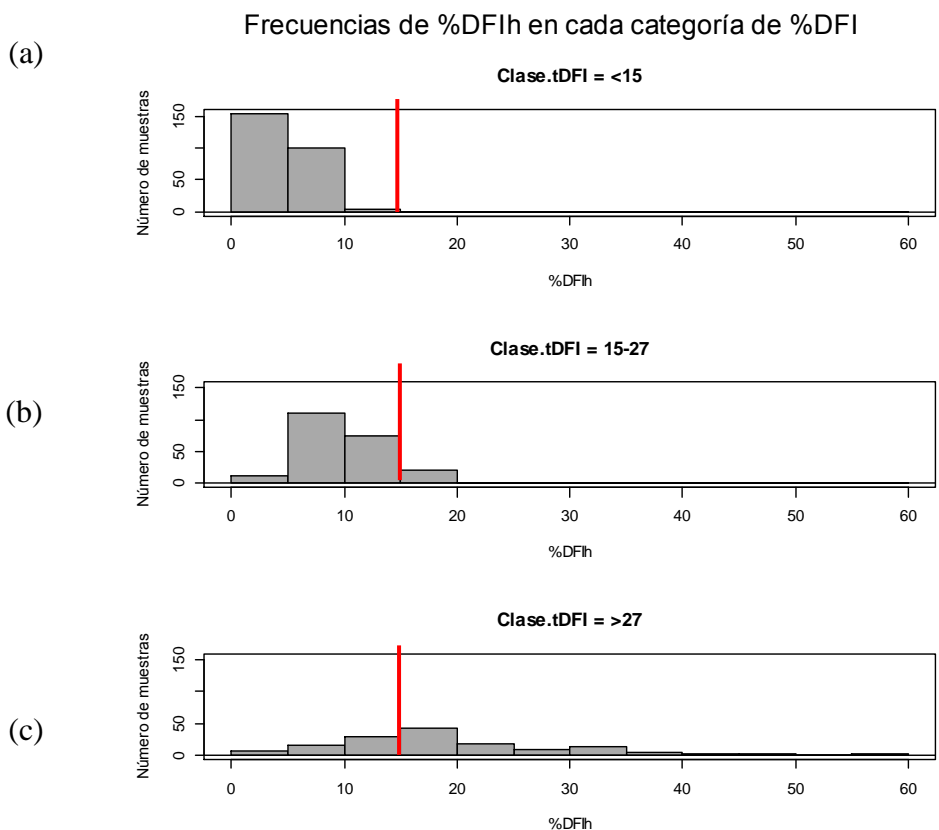


Figura 25: (a) Histograma de frecuencias de %DFIh dentro de la población con %DFI bajo (%DFI <15%, “Clase.tDFI=<15”). (b) Histograma de frecuencias de %DFIh dentro del grupo de %DFI intermedio (%DFI 15-27%, “Clase.tDFI=15-27”). (c) Histograma de frecuencias de %DFIh dentro del grupo de %DFI alto (%DFI>27%). La línea roja delimita el punto de corte estipulado en %DFIh>15%.

Tabla 5: Estudio de cada categoría de %DFIh (%DFIh<15% y %DFIh>15%) en función de cada población de %DFI. Los resultados se muestran en número de muestras del total y en porcentaje.

Tipo de conteo	<u>%DFI<15%</u>		<u>%DFI 15-27%</u>		<u>%DFI>27%</u>	
	%DFIh<15%	%DFIh>15%	%DFIh<15%	%DFIh>15%	%DFIh<15%	%DFIh>15%
Número	257	0	197	23	51	97
Porcentaje (%)	100	0	89,5	10,4	34,5	65,5

4.5. Análisis de los datos en las categorías de %HDS

Tal como se ha indicado anteriormente, se discriminaron dos grupos de muestras de acuerdo con su valor de %HDS: con un %HDS superior a un 15% y con un %HDS<15%. Se realizó un estudio general de cada parámetro dentro de cada categoría de %HDS y se representaron los resultados en Boxplots (*Figuras 26, 27, 28 y 29*). También se estudiaron la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada una de las categorías (*Tabla 6*).

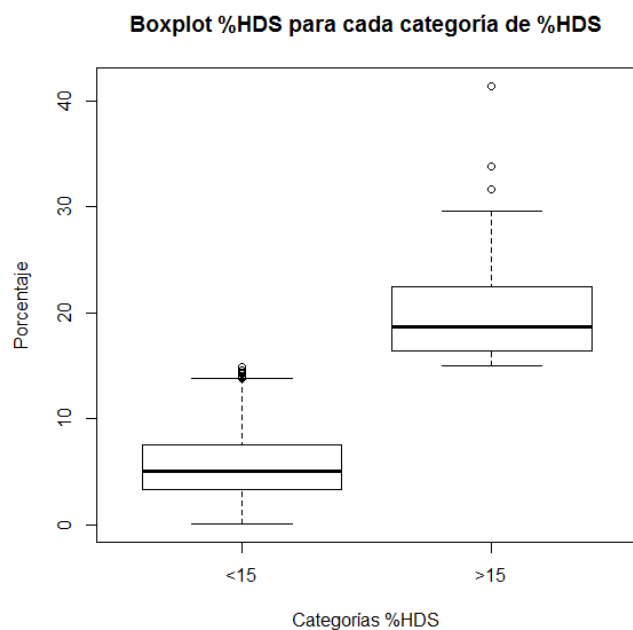


Figura 26: Distribución del %HDS en los subgrupos definidos para este parámetro: bajo (%HDS<15%, <15), y alto (%HDS>15%, >15).

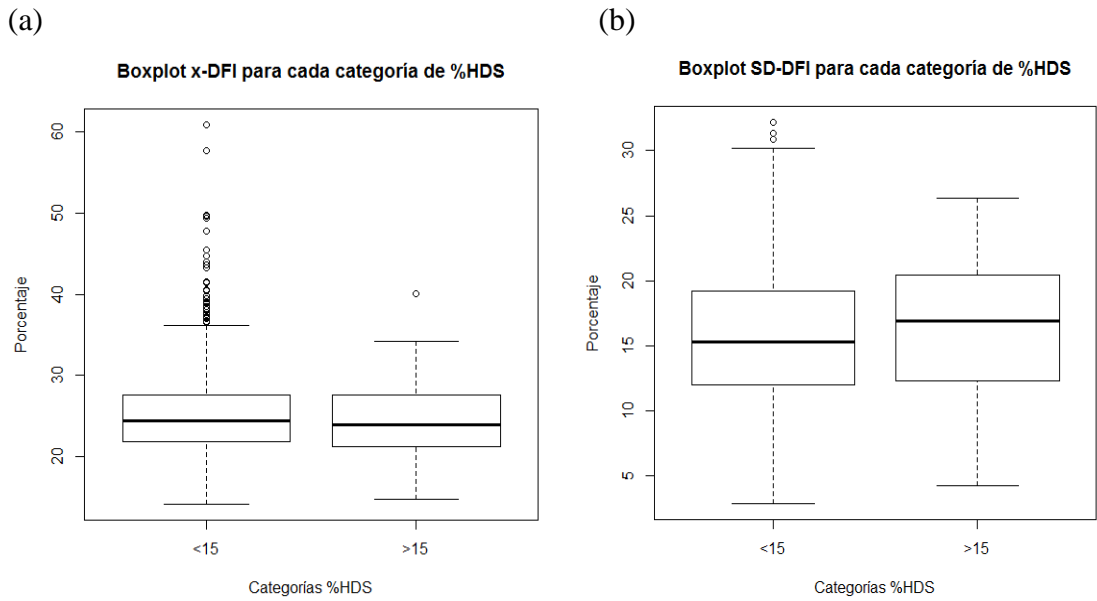


Figura 27: (a) Boxplot que muestra la distribución para x-DFI (media de fragmentación) en cada categoría de %HDS (bajo (%HDS<15%, <15), y alto (%HDS>15%, >15)). (b) Boxplot para SD-DFI (desviación estándar del DFI) en cada categoría de %HDS.

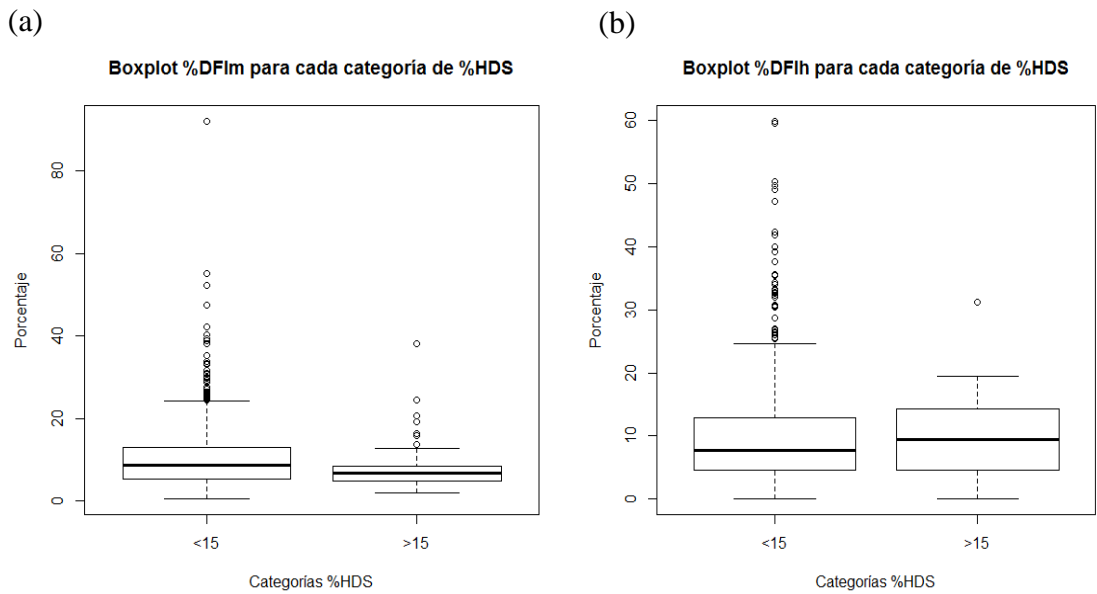


Figura 28: (a) Boxplot que muestra la distribución para %DFIm (porcentaje de fragmentación moderada) en cada categoría de %HDS (bajo (%HDS<15%, <15), y alto (%HDS>15%, >15)). (b) Boxplot para %DFIh (porcentaje de fragmentación alta) en cada categoría de %HDS.

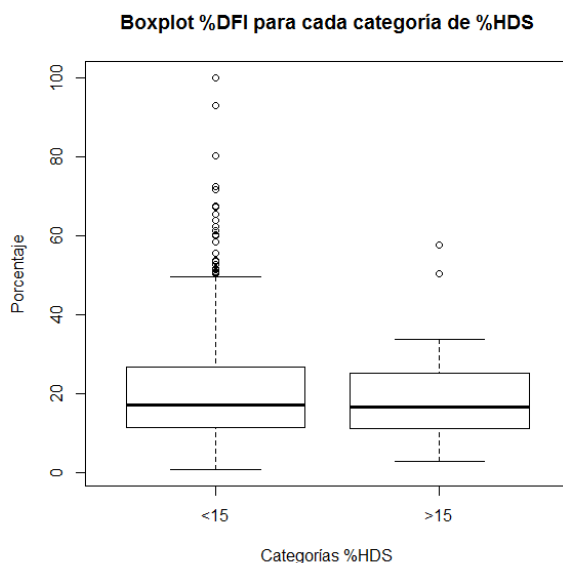


Figura 29: Boxplot que muestra la distribución para %DFI (porcentaje de fragmentación total), para cada categoría de %HDS (bajo (%HDS<15%, <15), y alto (%HDS>15%, >15)).

Tabla 6: Valores correspondientes a la media, desviación estándar (SD), y coeficiente de variación (CV%) para los parámetros x-DFI (media del DFI), SD-DFI (desviación estándar del DFI), %DFIm (porcentaje de DFI moderado), %DFIh (porcentaje de DFI alto), %DFI (DFI total), y %HDS (High DNA Stainability), en el conjunto de datos para %HDS<15% y %HDS>15%.

Parámetro	<u>%HDS<15%</u>		<u>%HDS>15%</u>	
	media±SD	CV%	media±SD	CV%
x-DFI	25,5±5,8	0,2	24,4±4,9	0,2
SD-DFI	15,7±5,3	0,3	16,7±5,5	0,3
%DFIm	10,7±8,4	0,8	8,7±6,6	0,7
%DFIh	10,1±8,6	0,8	10,1±6,6	0,6
%DFI	20,8±13,9	0,6	18,8±10,9	0,6
%HDS	5,8±3,2	0,5	20,3±5,7	0,3

4.6. Asociación entre %DFI y %HDS

Tras el estudio de la frecuencia y la distribución de los datos de cada parámetro, decidimos estudiar la posible relación entre el %DFI y el %HDS en el conjunto de datos filtrado para $n > 1000$, con el fin de poder encontrar una relación entre porcentaje de

fragmentación y otros daños en el DNA como la descondensación de la cromatina. Para ello, se aplicó el análisis por χ^2 de Pearson para estudiar la asociación entre las categorías de %DFI y %HDS. El resultado indicó que no hay evidencia de asociación entre el %DFI y el %HDS cuando se utilizan los puntos de corte indicados (*Tabla 7*). Se repitió el análisis utilizándose el corte en 15% de %DFI, para analizar la asociación entre ambas variables, no obteniéndose evidencia de asociación entre ambos parámetros (*Tabla 8*), por lo tanto, son independientes entre sí.

Tabla 7: Prueba de χ^2 de Pearson para las variables %DFI>27% y %HDS>15%.

<u>%DFI</u>	<u>%HDS</u>	
	%HDS<15%	%HDS>15%
%DFI<27%	438	39
%DFI>27%	142	6
χ^2	2,87	
Valor de p	0,09	

Tabla 8: Prueba de χ^2 de Pearson para las variables %DFI<15% y %HDS>15%.

<u>%DFI</u>	<u>%HDS</u>	
	%HDS<15%	%HDS>15%
%DFI<15%	238	19
%DFI>15%	342	26
χ^2	0,02	
Valor de p	0,87	

5. Discusión

El presente trabajo se llevó a cabo con el fin de analizar en profundidad los resultados obtenidos del análisis con la técnica SCSA de muestras seminales de pacientes de clínicas de reproducción asistida españolas. Se trató de un estudio retrospectivo descriptivo donde se analizaron los datos disponibles de los últimos 18

meses, para posteriormente comparar los resultados con la bibliografía disponible, y encontrar aplicaciones de la información obtenida.

Los resultados del análisis mostraron un 23,68% de pacientes con un %DFI superior al 27%. Esto nos indica que aproximadamente una cuarta parte de las muestras analizadas presentaron un porcentaje patológico de fragmentación, encontrándonos con valores extremos de incluso el 100% de fragmentación total (%DFI). Esto concuerda con algunos resultados anteriores, obtenidos del estudio de pacientes de centros de medicina reproductiva. En estos estudios, aproximadamente un 26% de los pacientes mostraron un valor de DFI total superior al umbral (Oleszczuk *et al.*, 2013; Smit *et al.*, 2007). Nuestro estudio además mostró la existencia de una asociación entre el porcentaje de DFI total y el %DFIh, con un 65,54% de muestras con alto %DFI y alto %DFIh, algo esperable teniendo en cuenta que el %DFIh es parte del DFI total. Esta relación ya había sido determinada anteriormente en semen de toro (García-Macías *et al.*, 2007). En cuanto al %HDS o inmadurez espermática, nuestros resultados mostraron sólo un 7,2% de pacientes con valores superiores al punto de corte estipulado para este parámetro del 15%.

En general, la mayor parte de nuestras muestras tuvieron un %DFI y %HDS que podríamos considerar como aceptables pero, en una tercera parte de los casos el estado de la cromatina espermática mostró claro indicio de patología, algo que podría ser causa de problemas de infertilidad. El estudio de la posible relación entre fragmentación total y el %HDS o inmadurez espermática dio como resultado una independencia entre ambos factores, ya que menos del 1% de las muestras presentaron un alto porcentaje de %DFI y %HDS a la vez. Sin embargo, a pesar de ser independientes entre sí, por sí solos ambos defectos pueden afectar a la fertilidad y a los resultados de las técnicas de reproducción asistida. El %DFI ha mostrado tener una relación directa con los parámetros convencionales estudiados en el semen (Evgeni *et al.* 2014). En un estudio de Virro *et al.* (2004), pacientes con un %DFI mayor de un 30% tenían 7 veces más posibilidades de presentar resultados anormales de los parámetros seminales, y por lo tanto ser identificados como “factor masculino”. La concentración, motilidad y morfología fueron significativamente más bajas en aquellas muestras con un %DFI>30%. En cuanto al %HDS, aquellos pacientes con un porcentaje superior al 15% presentaron 5 veces más posibilidad de presentar anomalías en el estudio de la

concentración, motilidad y morfología (Virro *et al.*, 2004). Además, se ha relacionado este parámetro con una posible disminución de las tasas de fertilización en FIV (Saleh *et al.*, 2003; Larson-Cook *et al.*, 2003; Henkel *et al.*; 2004; Virro *et al.*, 2004). En base a estos estudios, podemos pensar por lo tanto que dentro de nuestro grupo de pacientes con un porcentaje de daño en el DNA considerado como patológico, la fragmentación podría no ser el único factor relacionado con la infertilidad e ir relacionada con otras alteraciones en el seminograma.

Por otro lado, en el estudio de Virro *et al.* (2004), los pacientes con %DFI>30% mostraron mayor probabilidad de presentar bajas tasas de desarrollo hasta blastocisto, y por lo tanto mayores tasas de aborto, y menor probabilidad de un embarazo a término (Virro *et al.*, 2004). Bungum *et al.* (2004), compararon las tasas de embarazo, tanto en ciclos de inseminación artificial como en ciclos de FIV/ICSI, entre el grupo de varones que con un %DFI>27% y/o %HDS>10%, y aquellos con un porcentaje inferior al punto de corte para cada parámetro. En los ciclos de IA, las tasas de embarazo clínico y de niño nacido fueron cuatro veces inferiores en los varones con %DFI por encima del 27% y/o un %HDS superior al 10%, llegando a la conclusión de que el %DFI y el %HDS pueden tener valor predictivo del resultado del tratamiento por IA. Sin embargo, en los ciclos de FIV/ICSI estas tasas prácticamente no variaban. Desglosando los resultados de FIV e ICSI, sí observaron diferencias entre ambas técnicas, ya que en FIV la tasa de embarazo era la mitad que en ICSI cuando el %DFI superaba el valor umbral. Esta diferencia la atribuyeron a que en FIV, si los espermatozoides tienen altos porcentajes de fragmentación total o una menor condensación de la cromatina, tendrán menor probabilidad de fertilizar el ovocito correctamente debido a la falta de organización en su cromatina y a la imposibilidad de descondensarla para formar los pronúcleos. En ICSI el observador selecciona el espermatozoide que aparentemente presenta mejor motilidad y morfología, y por tanto tiene mucha probabilidad de ser el de menor nivel de daños en el DNA (Bungum *et al.*, 2004; Virro *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que espermatozoides morfológicamente normales pueden presentar altos porcentajes de fragmentación en el DNA, de forma que actualmente un 15% de los pacientes con problemas de fertilidad presentan un seminograma considerado como normal (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). De este modo, podemos estar introduciendo un espermatozoide con un porcentaje de daño en el DNA muy alto sin saberlo.

La fragmentación del ADN espermático es un parámetro que se incluyó en el estudio seminal de rutina hace relativamente poco tiempo. Tanto es así que se ha incluido por primera vez en la última edición del manual de la OMS (Cooper et al., 2010), donde se dedica una pequeña sección a este tema, aunque su determinación no está incluida dentro de los ensayos de rutina recomendados. A pesar de ello, numerosos autores han recomendado la aplicación rutinaria del estudio de los daños en el DNA espermático (Evenson *et al.*, 2002; Aitken and De Iuliis, 2010), tras haberse demostrado la clara relación entre la presencia de daños en el DNA y los parámetros de calidad seminal, así como del éxito de las técnicas de reproducción asistida. Además, la presencia de daños en el DNA constituye un factor de riesgo que atenta contra el desarrollo normal de los embriones y posiblemente también de su descendencia (Curti, 2010).

Como se ha comentado previamente, distintos niveles de fragmentación del DNA espermático y de condensación de la cromatina se han relacionado con el fracaso de determinadas técnicas de reproducción asistida. Dependiendo del tipo de alteración que presente la muestra, se puede recomendar la aplicación de una técnica u otra. En una pareja donde el %DFI se sitúa entre el 20% y 30%, el tiempo necesario para lograr un embarazo sería mayor que en aquellas con un menor nivel de %DFI, y ésta información puede ser útil en el asesoramiento de la pareja (Bungum *et al.*, 2011). Además, hoy en día se tiende cada vez más a la implantación de estudios y protocolos personalizados, por lo que es fundamental conocer el impacto que tiene cada parámetro en cada paciente.

Generalmente, en aquellas parejas donde el %DFI está cercano al 30% o presenta un porcentaje superior, debemos aconsejar la aplicación de FIV o ICSI como tratamientos de primera elección. La elección de la técnica dependerá del estado del resto de parámetros seminales, aunque por norma general, la técnica de elección es la ICSI por las altas tasas de éxito que ha mostrado en comparación con otras técnicas (Bungum *et al.*, 2004; Virro *et al.*, 2004; Evenson *et al.*, 2002). En la *Figura 30* se muestra un ejemplo de árbol de decisión para recomendar las técnicas más adecuadas para cada porcentaje de fragmentación espermática. Podríamos aplicar algunas de estas recomendaciones al conjunto de pacientes analizados. En nuestro conjunto de pacientes, dos tercios de las muestras mostraron un %DFI<27%, y un 90% de las mismas

resultaron en un %HDS<15%. Estos pacientes, dependiendo del tiempo de esterilidad y de la calidad del resto de parámetros seminales, podrían seguir intentando conseguir un embarazo natural (si el tiempo fuese superior a uno o dos años se recomendaría la inseminación artificial, contando con una concentración, motilidad y morfología aceptables). El resto de los pacientes irían claramente destinados a FIV o ICSI, ya que el estado de la cromatina espermática se sitúa en el rango patológico y probablemente presenten problemas de fertilidad debido a esta causa. La técnica de elección entre estas dos dependerá principalmente de la concentración, motilidad y morfología de la muestra (Bungum *et al.*, 2011), y se realizaría posteriormente a la aplicación de un método de selección, como columnas de Anexina-V (Evgeni *et al.*, 2014).

Dependiendo de la causa que genere el daño en el DNA espermático y el porcentaje de fragmentación, los pacientes podrían tener la posibilidad de disminuir este porcentaje de daño. De forma general, en primer lugar se realiza un estudio analítico y un seminograma a cada paciente, del cual podemos obtener un resultado normal o anormal. En función de éste resultado, se siguen una serie de directrices, que pueden seguirse en la tabla diagnóstica con los posibles tratamientos en función de la causa del daño en el DNA y el porcentaje del mismo mostrada en la *Figura 31* (Evgeni *et al.*, 2014). En caso de que el paciente curse con leucocitospermia o varicocele, y éstas patologías sean las causantes de los altos porcentajes de daño en el DNA, la solución sería el tratamiento con antibióticos específicos y personalizados, o la cirugía reparadora respectivamente (Evgeni *et al.*, 2014; Kadioglu *et al.*, 2014). Posterior a este tratamiento, se repetiría el análisis seminal completo, incluido el análisis de fragmentación espermática. Si la causa de fallos en la aplicación de las técnicas de reproducción asistida fuesen los altos porcentajes de fragmentación del DNA y no se encuentren causas concretas, deberíamos analizar en profundidad al paciente para saber qué solución es la más conveniente en su caso. Desafortunadamente, no contamos con datos sobre la casuística de las alteraciones en el DNA dentro de nuestro grupo de pacientes, por lo que sería interesante hacer estudios futuros con el fin de comparar los resultados en función de la causa del daño. Además, en caso de que los pacientes fuesen tratados, también podríamos comprobar la eficacia del tratamiento aplicado.

Por lo general, si el %DFI es inferior a un 30% y la calidad seminal no permite un embarazo natural o la fertilización por inseminación artificial, podemos aplicar

técnicas como la FIV o ICSI con una probabilidad aceptable de éxito (Bungum *et al.*, 2004; Virro *et al.*, 2004). Sin embargo, para el tercio de la población de nuestro estudio con graves daños en el DNA, cuya única posibilidad sería la FIV o la ICSI, las probabilidades de éxito en la aplicación de estas técnicas de reproducción asistida son mucho más bajas según los datos publicados (Bungum *et al.* 2004). En este caso, habría que añadir a la aplicación de éstas técnicas posibles tratamientos cuya eficacia aún no ha sido totalmente demostrada (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

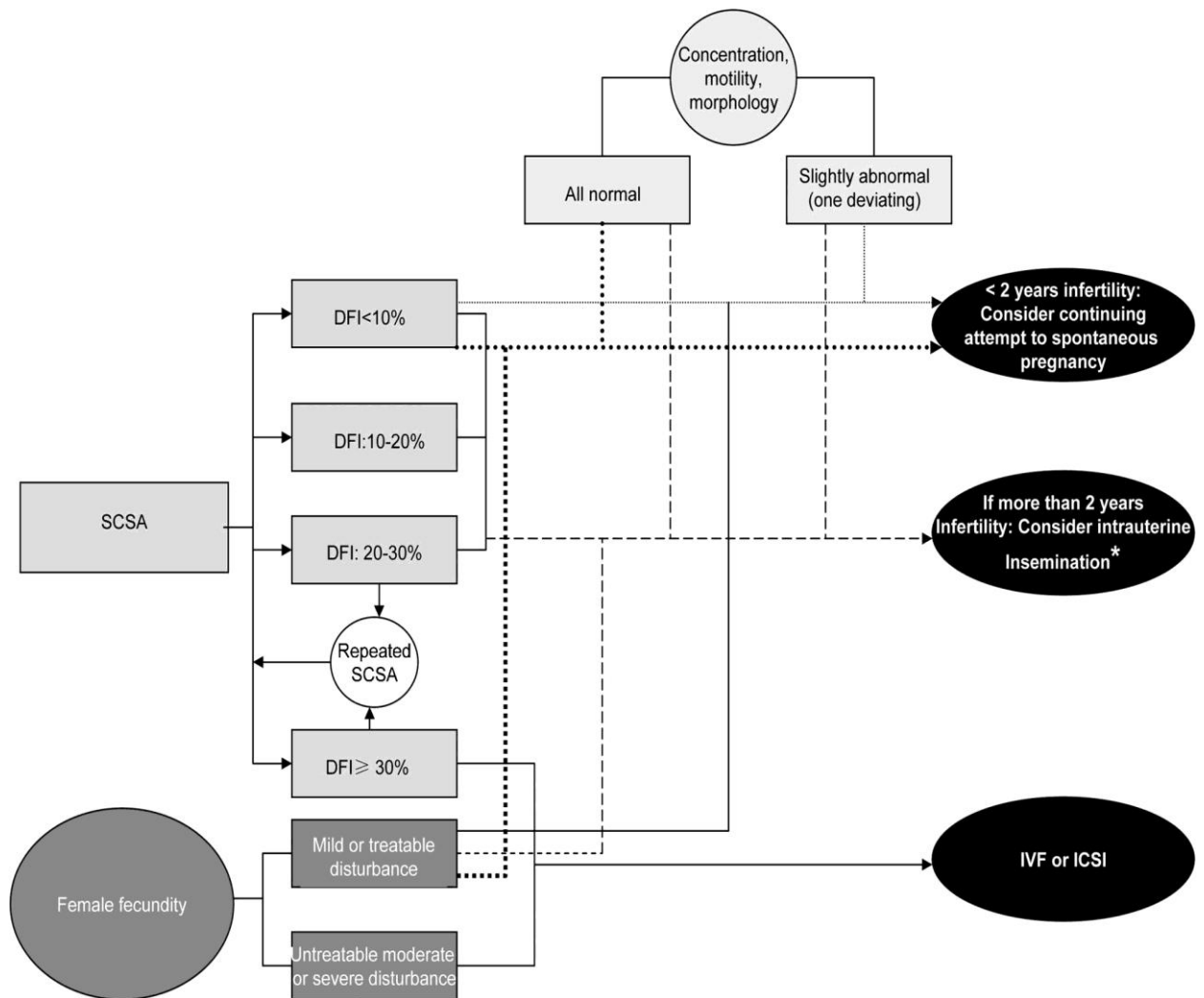


Figura 30: Diagrama de flujo que muestra las técnicas recomendadas para pacientes con un determinado porcentaje de DFI (Bungum *et al.*, 2011).

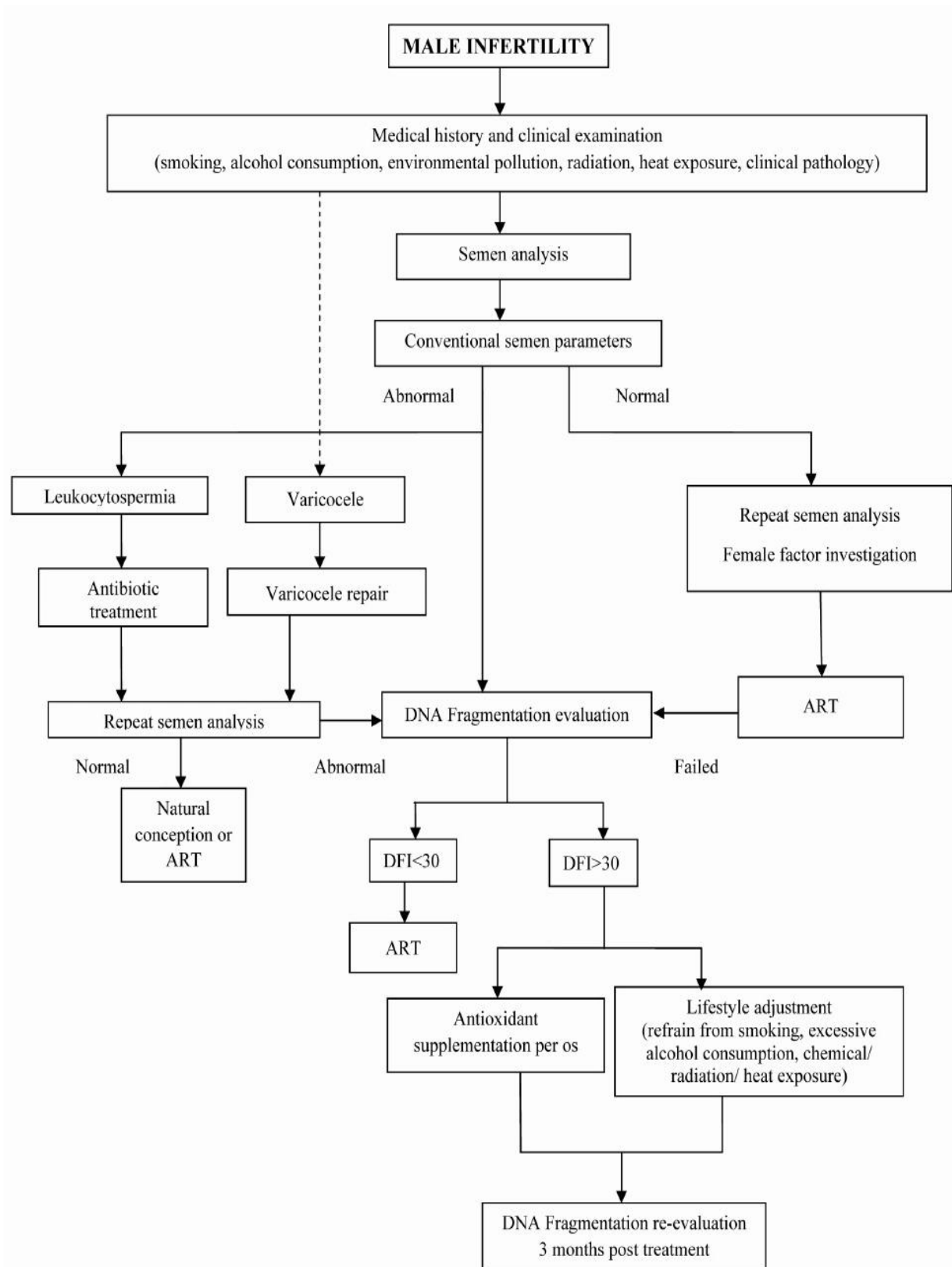


Figura 31: Algoritmo de evaluación diagnóstica-terapéutica de la infertilidad masculina relacionada con la fragmentación del DNA (Evgeni *et al.*, 2014).

Uno de los posibles tratamientos sería la administración de suplementos nutricionales como son vitaminas y antioxidantes. Se ha demostrado que el tratamiento con vitamina C y vitamina E durante dos meses reduce el porcentaje de fragmentación de DNA de los pacientes sometidos al mismo en comparación con aquellos que recibieron placebo (Greco *et al.*, 2005). En pacientes con oligoastenoteratozoospermia idiopática (IOAT), la solución podría estar en la administración de FSHr, ya que su aplicación durante 90 días mostró una reducción de los valores de fragmentación del DNA espermático (Colacurci *et al.*, 2012). Otras posibles soluciones podrían ser el cambio de los hábitos de vida, llevar una dieta sana, dejar de fumar, disminuir el consumo de alcohol, reducir la exposición al calor testicular, o reducir la exposición a tóxicos ambientales (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007; Evgeni *et al.*, 2014). Otro factor importante es la edad. Mokovtsev *et al.* (2006), en un estudio realizado en pacientes del Laboratorio de Andrología del Hospital Monte Sinai, demostraron que la media de %DFI en pacientes mayores de 45 años era prácticamente el doble en comparación con hombres de menor edad (32,0% y 15,2% respectivamente) (Moskovtsev *et al.*, 2006). Otros estudios en pacientes de clínicas de reproducción asistida han corroborado esta tendencia (Singh *et al.*, 2003; Vagnini *et al.*, 2007). La edad es un factor que afecta a toda la población, y no se ha encontrado solución ante su efecto. De todas formas, puede haber una gran variabilidad entre individuos también respecto a este factor. A pesar de existir ciertas esperanzas en el tratamiento de pacientes con altos porcentajes de daño en el DNA, es fundamental el estudio individual de cada paciente, con el fin de poder detectar el impacto real que cada parámetro tiene sobre el mismo, y encontrar así la mejor solución. La aplicación de protocolos y estudios personalizados, así como la terapia acomodada a las necesidades de cada paciente será la garantía del éxito futuro de las técnicas de reproducción asistida.

La prueba SCSA es un ensayo de naturaleza no invasiva con una alta sensibilidad y repetitividad a la hora de identificar daños en el DNA espermático. La realización de esta prueba en una muestra de semen antes de someter al paciente a FIV o ICSI puede ofrecer a las parejas información acerca de sus posibilidades reales de éxito, algo que no podríamos obtener con un análisis seminal de rutina como un seminograma. Se debe destacar no sólo la solidez de la prueba en cuanto a su sensibilidad y repetitividad, sino también la capacidad para proporcionar ocho variables relacionadas con la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina. Por este motivo, la

técnica SCSA hace una sólida contribución al perfil de análisis seminal y puede ser una herramienta diagnóstica y pronóstica efectiva en la evaluación de la fertilidad masculina, por lo que debería incluirse en cualquier estudio de calidad seminal.

6. Conclusiones

1.- Los resultados del análisis realizado mostraron que los daños en el DNA espermático son un factor de riesgo que afecta aproximadamente a un tercio de la población que acude a clínicas de reproducción asistida.

2.- Los daños presentes en el DNA pueden deberse a un alto porcentaje de fragmentación (%DFI), a un alto porcentaje de espermatozoides inmaduros (%HDS), o a la presencia de ambos. En nuestro estudio, en muy pocos casos se dio coincidencia de ambos parámetros, llegando a la conclusión de que son factores independientes entre sí.

3.- El estudio del impacto de la alta fragmentación (%DFI_h) en cada categoría de %DFI dio como resultado una relación entre ambos parámetros. Sin embargo, se encontraron muestras con un %DFI inferior al considerado como patológico, y un alto %DFI_h. Estos pacientes deberían someterse a un seguimiento con el fin de descartar posibles alteraciones ocasionadas por este hecho.

4.- La técnica SCSA es una prueba objetiva, rápida y segura, con un gran potencial pronóstico y diagnóstico, por lo que debería incluirse en cualquier estudio de calidad seminal.

5.- La presencia de DNA fragmentado en el espermatozoide puede tener un origen multifactorial, por lo que una de las líneas prioritarias de investigación debería centrarse en comprender cuáles son los mecanismos reales implicados en el inicio de este proceso. Por otro lado, es necesario conocer bajo qué circunstancias este factor afecta a la fertilidad de cada individuo, y personalizar y hacer efectivos los tratamientos y terapias.

7. Agradecimientos

Agradecer a Felipe Martínez Pastor su ayuda y colaboración en este trabajo, por estar siempre pendiente de mis dudas y corregir los errores que pudiese cometer. Del mismo modo, agradecer a María Mata y Jéssica Alonso el tiempo invertido en enseñarme los detalles del protocolo para realizar la técnica SCSA, manejarme en el día a día en el laboratorio y responder a todas mis inquietudes. Gracias a Ángel Luengos y Elsi Suárez del Centro Ginecológico de León por su aportación de muestras seminales y su apoyo. Del mismo modo, gracias a la clínica Ginefiv, Crea Valencia, CER Santander, Vithas y FIV4, por confiar en el equipo y ser usuarios del servicio de análisis espermático.

Y muy especialmente, gracias a mis padres, mi hermana y mi pareja, por confiar siempre en mí, incluso cuando yo misma no lo hacía, y apoyarme en todos mis propósitos. Sin ellos, nada de esto hubiese sido posible.

8. Referencias bibliográficas

- Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular human reproduction*, 16(1), 3-13.
- Allam, J. P., Fronhoffs, F., Fathy, A., Novak, N., Oltermann, I., Bieber, T., ... & Haidl, G. (2008). High percentage of apoptotic spermatozoa in ejaculates from men with chronic genital tract inflammation. *Andrología*, 40(5), 329-334.
- Aravindan, G. R., Bjordahl, J., Jost, L. K., & Evenson, D. P. (1997). Susceptibility of Human Sperm to in Situ DNA Denaturation Is Strongly Correlated with DNA Strand Breaks Identified by Single-Cell Electrophoresis. *Experimental cell research*, 236(1), 231-237.
- Atig, F., Raffa, M., Ali, H. B., Abdelhamid, K., Saad, A., & Ajina, M. (2012). Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of tunisian infertile men. *International journal of biological sciences*, 8(1), 139.

- Balercia, G., Arnaldi, G., Fazioli, F., Serresi, M., Alleva, R., Mancini, A., Mosca, F., Lamonica, G.R., Mantero, F., Littarru, G.P.** (2002). Coenzyme Q10 levels in idiopathic and varicocele-associated asthenozoospermia. *Andrología*, 34:107–111.
- Balercia, G., Buldreghini, E., Vignini, A., Tiano, L., Paggi, F., Amoroso, S., Ricciardo-Lamonica, R., Boscaro, M., Lenzi, A., Littarru, G.** (2009). Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertility and Sterility*, 91:1785–1792.
- Ballachey, B. E., Hohenboken, W. D., & Evenson, D. P.** (1987). Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biology of reproduction*, 36(4), 915-925.
- Ballachey, B. E., Evenson, D. P., & SAACKE, R. G.** (1988). The sperm chromatin structure assay relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *Journal of andrology*, 9(2), 109-115.
- Benedetti, S., Tagliamonte, M. C., Catalani, S., Primiterra, M., Canestrari, F., Stefani, S. D., ... & Bulletti, C.** (2012). Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reproductive biomedicine online*, 25(3), 300-306.
- Bianchi, P. G., Manicardi, G. C., Urner, F., Campana, A., & Sakkas, D.** (1996). Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 2(3), 139-144.
- Billig, H., Chun, S. Y., Eisenhauer, K., & Hsueh, A. J.** (1996). Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Human reproduction update*, 2(2), 103-117.
- Brinkworth, M. H.** (2000). Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *International journal of andrology*, 23(3), 123-135.
- Bungum, M., Humaidan, P., Spano, M., Jepson, K., Bungum, L., Giwercman, A.** (2004). The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reproduction*, 19: 1401-8. 44.
- Bungum, M., Bungum, L., & Giwercman, A.** (2011). Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian journal of andrology*, 13(1).

- Burrello, N., Arcidiacono, G., Vicari, E., Asero, P., Di Benedetto, D., De Palma, A., ... & Calogero, A. E.** (2004). Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Human Reproduction*, 19(10), 2298-2302.
- Calvin, H. I., Bedford, J.M.** (1971). Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility* ;13 Suppl 13: 65-75.
- Check, J. H., Graziano, V., Cohen, R., Krotec, J., & Check, M. L.** (2005). Effect of an abnormal sperm chromatin structural assay (SCSA) on pregnancy outcome following (IVF) with ICSI in previous IVF failures. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 51(2), 121-124.
- Colacurci, N., Monti, M. G., Fornaro, F., Izzo, G., Izzo, P., Trotta, C., ... & Franciscis, P.** (2012). Recombinant human FSH reduces sperm DNA fragmentation in men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Journal of andrology*, 33(4), 588-593.
- Cooper, T.G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W., Behre, H.M. et al.** (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*; 16(3): 231-245.
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Dávila-Rodríguez, M. I., López-Fernández, C., Fernández, J. L., & Gosálvez, J.** (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*, 31(2), 120-131.
- Curti, G.** (2010). Estudio del daño del ADN espermático en pacientes infértiles. Tesina de Grado de la Licenciatura en Biología Humana. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias.32 p.
- D'Aniello, A., Di Cosmo, A., Di Cristo, C., Annunziato, L., Petrucelli, L., Fisher, G.H.** (1996). Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Sciences*, 59:97–104. 24.
- D'Aniello, G., Ronsini, S., Guida, F., Spinelli, P., D'Aniello, A.** (2005). Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: possible role in reproduction. *Fertility and Sterility*, 84:1444–1449.
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T., & Melamed, M. R.** (1975). Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Experimental cell research*, 90(2), 411-428.

- Ebisch, I. M. W., Thomas, C. M. G., Peters, W. H. M., Braat, D. D. M., & Steegers-Theunissen, R. P. M.** (2007). The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human Reproduction Update*, 13(2), 163-174.
- Estop, A.M., Munne, S., Jost, L.K., Evenson, D.P.** (1993). Alterations in sperm chromatin structure correlates with cytogenetic damage of mouse sperm following in vitro incubation. *Journal of Andrology* 14: 282–288.
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., & Melamed, M. R.** (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210(4474), 1131-1133.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Baer, R. K., Turner, T. W., & Schrader, S. M.** (1991). Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Toxicology*, 5(2), 115-125.
- Evenson, D.P., Jost, L.K., Baer, R.K.** (1993). Effects of methyl methanesulfonate on mouse sperm chromatin structure and testicular cell kinetics. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 21: 144–153.
- Evenson, D. P., Thompson, L., & Jost, L.** (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*, 41(3), 637-651.
- Evenson, D. P.** (1999). Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(1), 1-16.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Marshall, D., Zinaman, M. J., Clegg, E., Purvis, K., ... & Claussen, O. P.** (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, 14(4), 1039-1049.
- Evenson, D.P., Jost, L.K., Corzett, M., Balhorn, R.** (2000). Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *Journal of Andrology*, 21:739–746.
- Evenson, D., & Jost, L.** (2000). Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Science*, 22(2-3), 169-189.
- Evenson, D. P., LARSON, K. L., & Jost, L. K.** (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*, 23(1), 25-43.

- Evenson, D., & Wixon, R.** (2006). Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive biomedicine online*, 12(4), 466-472.
- Evgeni, E., Charalabopoulos, K., & Asimakopoulos, B.** (2014). Human Sperm DNA Fragmentation and its Correlation with Conventional Semen Parameters. *Journal of reproduction & infertility*, 15(1), 2.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, K. L.** (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1), 37-59.
- Fernández, J. L., Vázquez-Gundín, F., Delgado, A., Goyanes, V. J., Ramiro-Díaz, J., De la Torre, J., & Gosálvez, J.** (2000). DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 453(1), 77-82.
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G.** (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*, 24(1), 59-66.
- Fernández, J. L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., ... & De Jonge, C.** (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and sterility*, 84(4), 833-842.
- Fraga, C. G., Motchnik, P. A., Wyrobek, A. J., Rempel, D. M., & Ames, B. N.** (1996). Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 351(2), 199-203.
- Franken, D. R., Franken, C. J., De La Guerre, H., & De Villiers, A.** (1999). Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrología*, 31(6), 361-366.
- Gallegos, G., Ramos, B., Santiso, R., Goyanes, V., Gosálvez, J., & Fernández, J. L.** (2008). Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertility and sterility*, 90(2), 328-334.
- Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., ... & Lenzi, A.** (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15(4), 830-839.

- García-Macías, V., De Paz, P., Martínez-Pastor, F., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Bernardo, J., ... & Anel, L. (2007).** DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *International journal of andrology*, 30(2), 88-98.
- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., & Darzynkiewicz, Z. (1993).** Presence of DNA Strand Breaks and Increased Sensitivity of DNA *in Situ* to Denaturation in Abnormal Human Sperm Cells: Analogy to Apoptosis of Somatic Cells. *Experimental cell research*, 207(1), 202-205.
- Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., ... & Tesarik, J. (2005).** Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human Reproduction*, 20(1), 226-230.
- Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., & Tesarik, J. (2005).** Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *Journal of andrology*, 26(3), 349-353.
- Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., ... & Kruger, T. F. (2004).** Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and sterility*, 81(4), 965-972.
- Hofmann, N., & Hilscher, B. (1991).** Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Human Reproduction*, 6(7), 979-982.
- Huang, C. C., Lin, D. P. C., Tsao, H. M., Cheng, T. C., Liu, C. H., & Lee, M. S. (2005).** Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility and sterility*, 84(1), 130-140.
- Irvine, D. S., Twigg, J. P., Gordon, E. L., Fulton, N., Milne, P. A., & Aitken, R. (2000).** DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology*, 21(1), 33-44.
- Jager, S. (1990).** Sperm nuclear stability and male infertility. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 25(3), 253-259.
- Kadioglu T.C., Aliyev E., Celtik M. (2014).** Microscopic Varicocelelectomy Significantly Decreases the Sperm DNA Fragmentation Index in Patients with Infertility. *BioMed Research International*. Volume 2014, Article ID 695713, 4 pages.

- Kobayashi, H., Larson, K., Sharma, R. K., Nelson, D. R., Evenson, D. P., Toma, H., ... & Agarwal, A.** (2001). DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and sterility*, 75(3), 469-475.
- Larson, K.L., Brannian, J.D., Timm, B.K., Jost, L.K., Evenson, D.P.** (1999). Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove sperm with damaged chromatin structure. *Human Reproduction*, 14:2015–2019.
- Larson, K.L., De Jonge, C.J., Barnes, A.M., Jost, L.K., Evenson, D.P.** (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human Reproduction*, 15:1717–1722.
- Larson, K. L., Brannian, J. D., Singh, N. P., Burbach, J. A., Jost, L. K., Hansen, K. P., ... & Evenson, D. P.** (2001). Chromatin structure in globozoospermia: a case report. *Journal of andrology*, 22(3), 424-431.
- Larson-Cook, K. L., Brannian, J. D., Hansen, K. A., Kaspersen, K. M., Aamold, E. T., & Evenson, D. P.** (2003). Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and sterility*, 80(4), 895-902.
- Leduc, F., Nkoma, G. B., & Boissonneault, G.** (2008). Spermiogenesis and DNA repair: a possible etiology of human infertility and genetic disorders. *Systems biology in reproductive medicine*, 54(1), 3-10.
- Levitas, E., Lunenfeld, E., Weiss, N., Friger, M., Har-Vardi, I., Koifman, A., et al.** (2005). Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. *Fertility and Sterility*, 83:1680–6.
- Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J. G., & Casper, R. F.** (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13(4), 896-900.
- Manicardi, G. C., Bianchi, P. G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U., & Sakkas, D.** (1995). Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biology of reproduction*, 52(4), 864-867.
- McPherson, S. M., & Longo, F. J.** (1993). Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Developmental biology*, 158(1), 122-130.

- Ménézo, Y. J., Hazout, A., Panteix, G., Robert, F., Rollet, J., Cohen-Bacrie, P., ... & Benkhalifa, M.** (2007). Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reproductive biomedicine online*, 14(4), 418-421.
- Mohammad, H. N. E., Mohammad, S., Shahnaz, R., Maryam, A., Shahla, R., Fariba, M., & Mohammad, M.** (2005). Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reproductive biomedicine online*, 11(2), 198-205.
- Morales, R., Lledó, B., Ortiz, J., Rodríguez-Arnedo, D., Fabregat, A., & Bernabeu, R.** (2007). Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 24(5).
- Morris, I. D.** (2002). Sperm DNA damage and cancer treatment. *International journal of andrology*, 25(5), 255-261.
- Moskovtsev, S. I., Willis, J., & Mullen, J. B. M.** (2006). Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertility and sterility*, 85(2), 496-499.
- Nagata, Y., Homma, H., Lee, J.A., Imai, K.** (1999). D-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells. *FEBS Letters*, 444:160–164. 25.
- O'Flaherty, C., Vaisheva, F., Hales, B. F., Chan, P., & Robaire, B.** (2008). Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Human reproduction*, 23(5), 1044-1052.
- Oleszczuk, K., Augustinsson, L., Bayat, N., Giwercman, A., & Bungum, M.** (2013). Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples. *Andrology*, 1(3), 357-360.
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Agarwal, A., Larson, K., ... & Alvarez, J. G.** (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reproduction*, 16(9), 1912-1921.
- Ostling, O., & Johanson, K. J.** (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), 291-298.
- Pant, N., Shukla, M., Upadhyay, A.D., Chaturvedi, P.K., Saxena, D.K., Gupta, Y.K.** (2014). Association between environmental exposure to p, p'-DDE and lindane and semen quality. *Environmental Science and Pollution Research International*. May 6.

- Penfold, L. M., Jost, L., Evenson, D. P., & Wildt, D. E.** (2003). Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. *Biology of reproduction*, 69(5), 1730-1735.
- Pentikäinen, V., Erkkilä, K., & Dunkel, L.** (1999). Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 276(2), E310-E316.
- Pons, I., Cercas, R., Villas, C., Braña, C., & Fernández-Shaw, S.** (2013). One abstinence day decreases sperm DNA fragmentation in 90% of selected patients. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(9), 1211-1218.
- Rodríguez, B., López-Fernández, C., Núñez-Calonge, R., Caballero, P., Martínez-Moya, M., Alonso, C., ... & Gosálvez, J.** (2012). Varicocele, leucocitospermia y su impacto en la fragmentación del ADN espermático. *Revista Internacional de Andrología*, 10(1), 3-10.
- Rubes, J., Selevan, S. G., Sram, R. J., Evenson, D. P., & Perreault, S. D.** (2007). GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 625(1), 20-28.
- Sakkas, D., Urner, F., Bianchi, P. G., Bizzaro, D., Wagner, I., Jaquenoud, N., ... & Campana, A.** (1996). Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 11(4), 837-843.
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G.** (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and sterility*, 93(4), 1027-1036.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Nada, E. A., El-Tonsy, M. H., Sharma, R. K., Meyer, A., ... & Thomas Jr, A. J.** (2003). Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 79, 1597-1605.
- Sepaniak, S., Forges, T., Gerard, H., Foliguet, B., Bene, M. C., & Monnier-Barbarino, P.** (2006). The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology*, 223(1), 54-60.
- Shen, H. M., & Ong, C. N.** (2000). Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(4), 529-536.

- Singh, N. P., Muller, C. H., & Berger, R. E.** (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and sterility*, 80(6), 1420-1430.
- Smit, M., Dohle, G. R., Hop, W. C. J., Wildhagen, M. F., Weber, R. F. A., & Romijn, J. C.** (2007). Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic. *International journal of andrology*, 30(1), 48-55.
- Smith, R., Kaune, H., Parodi, D., Madariaga, M., Ríos, R., Morales, I., & Castro, A.** (2006). Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Human Reproduction*, 21(4), 986-993.
- Spano, M., Kolstad, A.H., Larsen, S.B., Cordelli, E., Leter, G., Giwercman, A., Bonde, J.P.**(1998). The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepios. Human Reproduction*, 13:2495–2505.
- Sun, J. G., Jurisicova, A., & Casper, R. F.** (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 56(3), 602-607.
- Talevi, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Longobardi, S., & Gualtieri, R.** (2013). Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), 81.
- Tesarik, J., Mendoza, C., & Greco, E.** (2002). Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*, 17(1), 184-189.
- Tesarik, J., Greco, E., & Mendoza, C.** (2004). Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction*, 19(3), 611-615.
- Twigg, J. P., Irvine, D. S., & Aitken, R. J.** (1998). Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 13(7), 1864-1871.
- Vagnini, L., Baruffi, R. L. R., Mauri, A. L., Petersen, C. G., Massaro, F. C., Pontes, A., ... & Franco Jr, J. G.** (2007). The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reproductive biomedicine online*, 15(5), 514-519.

- Virro, M. R., Larson-Cook, K. L., & Evenson, D. P.** (2004). Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and sterility*, 81(5), 1289-1295.
- Wdowiak, A., Racziewicz, D., Stasiak, M., Bojar, I.** (2014). Levels of FSH, LH and testosterone, and sperm DNA fragmentation. *Neuro Endocrinology Letters*, 35(1):73-9.
- Wright, C., Milne, S., & Leeson, H.** (2014). Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive biomedicine online*.
- Xia, Y., Cheng, S., Bian, Q., Xu, L., Collins, M. D., Chang, H. C., ... & Wang, X.** (2005). Genotoxic effects on spermatozoa of carbaryl-exposed workers. *Toxicological Sciences*, 85(1), 615-623.
- Zini, A., Kamal, K., Phang, D., Willis, J., Jarvi, K.** (2001). Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology*. Aug;58(2):258-61.
- Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., & Zenzes, M. T.** (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and sterility*, 75(4), 674-677.