

**CARACTERIZACIÓN MÚLTIPLE DE LA
FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN
PACIENTES INFÉRTILES**

Memoria presentada por **Agustín García Peiró** para aspirar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona en el programa de doctorado de Biología Celular

Bellaterra, Junio de 2012

El Dr. Jordi Benet Català, Profesor Catedrático de la UAB, la Dra. Maria Oliver Bonet Profesora Asociada de Universidad de la UAB, y la Dra. Joaquina Navarro i Ferreté, Profesora Catedrática de Universidad de la UAB del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICAN

Que Agustín García Peiró ha realizado bajo su dirección, en la Unidad de Biología Celular y Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, el trabajo que, para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona en el programa de Doctorado de Biología Celular, presenta con el título de

**CARACTERIZACIÓN MÚLTIPLE DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN
ESPERMÁTICO EN PACIENTES INFÉRTILES**

Jordi Benet i Català

Maria Oliver Bonet

Joaquina Navarro i Ferreté

Bellaterra, Junio 2012

A mi familia, y especialmente a mis abuelos, Agustín y Felicidad,
a quienes con esta dedicatoria,
y a estas alturas de la vida,
espero sorprender.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las personas que han contribuido a la realización de esta tesis doctoral. En primer lugar a mis directores de tesis Maria Oliver Bonet, Joaquina Navarro y Jordi Benet por confiar en mi y darme la oportunidad de realizar este trabajo, la oportunidad de investigar, y que no pudo llegar en mejor momento.

Asímismo quiero agradecer a todos mis compañeros de la unidad de Biología Celular y Genética Médica el hacer posible que el lugar de trabajo sea un lugar grato y estimulante muy adecuado para el desarrollo de nuevas ideas y adquisición de habilidades y en definitiva un lugar para crecer. En mayor o menor medida todos sois responsables de las capacidades y conocimientos que he ido adquiriendo durante estos años de aprendizaje y cuyo resultado se materializa en esta tesis doctoral que os dedico a todos vosotros. Especialmente quiero agradecer a los más jóvenes del grupo Jordi Ribas y Alba Fernández lo muchísimo que he aprendido de vosotros. Quiero animaros a continuar con vuestros trabajos, de algún modo continuación de este, y en cuyas páginas se verá la importancia que la fragmentación del ADN espermático representa en el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina. Montse Pau, Maestra, gracias por enseñarme. Y aunque ya no te voy a poder llevar a los toros sabes que te quiero.

No puedo terminar sin agradecer a mi familia y especialmente a Lidia y a mis hijos, Blanca y Daniel, su apoyo y cariño durante estos años y porque sencillamente, vosotros sois la razón por la que hago lo que hago.

Gracias a todos.

Agustín García Peiró

24 de mayo de 2012

Agradecer a las instituciones que han dado soporte económico a este trabajo:

Ministerio de Sanidad: proyectos FIS PI051834 i FIS PI080623

Generalitat de Catalunya: 2005 SGR-00495 i 2009 SGR-1107

A la Càtedra de Recerca Eugin-UAB (2009-2010; 2010-1011; 2011-2012).

Investigador responsable: Jordi Benet Català

ÍNDICE

1- Introducción	1
1.1 La espermatogénesis: meiosis y espermiogénesis	3
1.2 El ADN espermático	5
1.2.1 ADN nuclear.....	6
1.2.2 ADN mitocondrial.....	13
1.3 Fragmentación del ADN espermático.....	15
1.3.1 Causas de fragmentación del ADN espermático nuclear	18
1.3.1.1 Estrés Oxidativo.....	19
1.3.1.2 Apoptosis Abortiva.....	21
1.3.1.3 Activación de caspasas y endonucleasas	23
1.3.1.4 Alteraciones en el empaquetamiento de la cromatina	23
1.3.1.5 Infecciones / inflamaciones	24
1.3.1.6 Quimioterapia y radioterapia	25
1.3.1.7 Exposición a tóxicos	26
1.3.1.8 Estilo de vida	27
1.3.1.9 Radiación electromagnética.....	28
1.4 Infertilidad e infertilidad masculina /Efecto de la fragmentación del ADN en reproducción humana.....	29
1.5 Métodos de determinación de la fragmentación del ADN espermático	32
1.5.1 TUNEL (Terminal transferase dUTP Nick-End Labeling).....	32
1.5.2 SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)	34
1.5.3 SCDt (Sperm Chromatin Dispersion test)	35
1.6 Infertilidad asociada a fragmentación del DNA espermático: tipología del paciente	36
1.6.1 Varicocele.....	37

1.6.1.1 Diagnostico del varicocele.....	38
1.6.1.2 Fisiopatología del varicocele	39
1.6.1.3 Tratamiento del Varicocele.....	40
1.6.2 Portadores de reorganizaciones cromosómicas	40
1.6.2.1 Reorganizaciones cromosómicas estructurales.....	41
1.6.2.2 Reorganizaciones cromosómicas y fertilidad	42
1.6.3 Astenoteratozoospermia (ATZ).....	42
2- Objetivos	45
3- Material y Métodos	51
3.1 Procedencia, obtención y criopreservación de las muestras.	53
3.1.1 Procedencia.....	53
3.1.2 Grupos de pacientes y controles	53
3.1.3 Obtención de muestras	54
3.1.4 Criopreservación.....	55
3.1.4.1 Preparación del medio de criopreservación para muestras de semen... 55	
3.1.4.2 Criopreservación en TYB	56
3.1.4.3 Descongelación de la muestra, lavado y ajuste de la concentración espermática	56
3.2 Técnicas de estudio de la fragmentación del ADN espermático	57
3.2.1 TUNEL (Terminal transferase dUTP Nick-End Labeling)	57
3.2.2 SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)	62
3.2.3 SCDt (Sperm Chromatin Dispersion test)	65
3.3 Dinámica de la fragmentación del ADN espermático	67
3.4 Determinación de la relación Protamina 1/ Protamina 2	67
3.4.1 Extracción de proteínas espermáticas.....	67

3.4.2 Separación de proteínas, preparación de los geles de acrilamida.....	70
3.4.3 Pre-electroforesis.....	71
3.4.4 Electroforesis.....	72
3.4.5 Tinción de los geles.....	72
4- Resultados.....	75
4.1 Artículo 1.....	77
4.2 Artículo 2.....	85
4.3 Artículo 3.....	97
4.4 Artículo 4.....	109
4.5 Artículo 5.....	119
4.6 Artículo 6.....	142
5- Discusión.....	165
5.1 Valoración de las técnicas utilizadas.....	167
5.2 Valoración de otras subpoblaciones espermáticas.....	171
5.3 Determinación de la fragmentación en los grupos de pacientes estudiados.....	175
5.3.1. Portadores de reorganizaciones cromosómicas.....	175
5.3.1.1 El caso del 9qh+++.....	177
5.3.2 Varicocele.....	179
5.4 Valoración de la dinámica de fragmentación del ADN espermático.....	181
5.5 Protaminas.....	184
5.6 Antioxidantes y fragmentación.....	185
6- Conclusiones.....	189
7- Bibliografía.....	195

ABREVIATURAS

8-OHdG	8-oxodeoxiguanina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNds	ADN double strand break (rotura de doble cadena)
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
ADNss	ADN single strand break (rotura de cadena simple)
AO	Acridine Orange (Naranja de Acridina)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN transferente
ATP	Adenosintrifosfato
BSA	Bovine Serum Albumin
DDS	DNA Degraded Sperm
DFI	DNA Fragmentation Index
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen diamino tetracético
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FICT	Isotiocianato de Fluoresceína
FIV	Fecundación In Vitro
HDS	High DNA stainability
HNE	4-hidroxi-nonenal
ICSI	Intra Cytoplasmatic Sperm Injection
IUI	Inseminación Intrauterina
M540	Merodicina 540
MAR	Matrix Attachment Regions
MDA	Malondialdehído
NO	Óxido de nitrógeno
OH	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
P1/P2r	Relación Protamina 1/ protamina 2
PBS	Phosphate Buffer Saline
RO	Radical alcóxido
ROO	Radical peróxido
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
SDF	Sperm DNA Fragmentation
TdT	Transferasa Terminal
TUNEL	Terminal transferase dUTP Nick-End-Labeling
VC	Varicocele clínico
VSc	Varicocele subclínico

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La espermatogénesis: meiosis y espermiogénesis

La espermatogénesis es un proceso que tiene como finalidad la producción continua de millones de espermatozoides completamente diferenciados durante todo el periodo de la vida fértil del individuo. En mamíferos euterianos, la producción de espermatozoides comprende un rango que oscila entre los 200 millones en el hombre y hasta los 2 ó 3 billones en toros. Este proceso se realiza en la gónada masculina o testículo y se subdivide en tres fases: una fase proliferativa, una fase de reducción cromosómica o meiosis y una fase de especialización y diferenciación celular que recibe el nombre de espermiogénesis.

En el hombre, la fase proliferativa consiste en sucesivas divisiones mitóticas de las células espermatogénicas y espermatogonias de modo que de las dos células resultantes, una de ellas se sitúa en el compartimento adluminal para iniciar el proceso de división meiótica, mientras que la otra permanece en la capa basal del epitelio seminífero para generar, mediante sucesivas divisiones mitóticas, nuevas células meióticas y nuevas espermatogonias. De esta manera se asegura la perpetuación y la renovación constante del proceso espermatogénico.

Como producto final del proceso, por cada célula que inicie la división celular meiótica se obtienen cuatro espermatozoides haploides. Desde un punto de vista genético, la principal característica de los espermatozoides respecto al resto de las células somáticas es que contienen la mitad del contenido cromosómico que éstas. Cada célula somática de los diferentes órganos y tejidos que conforman el ser humano tiene, en condiciones normales, dos copias de 23 tipos diferentes de cromosomas. Así pues, el genoma humano diploide ($2n$) está compuesto por 46 cromosomas de los cuales 23 son de origen paterno y los aporta el espermatozoide y los otros 23 son de origen materno y los aporta el óvulo.

Tras la meiosis, y como consecuencia de ella, los gametos (ovocito y espermatozoide) poseen un solo representante, (1-22, X o 1-22, Y) de los $n=23$ cromosomas. De este modo, cuando un espermatozoide fecunda a un ovocito, la fusión del pronúcleo masculino y el pronúcleo femenino dará lugar a un nuevo cigoto diploide, con 23 pares de cromosomas ($2n=46$). Así pues, gracias a la meiosis se consigue mantener constante el número de cromosomas de la especie a lo largo de las sucesivas generaciones.

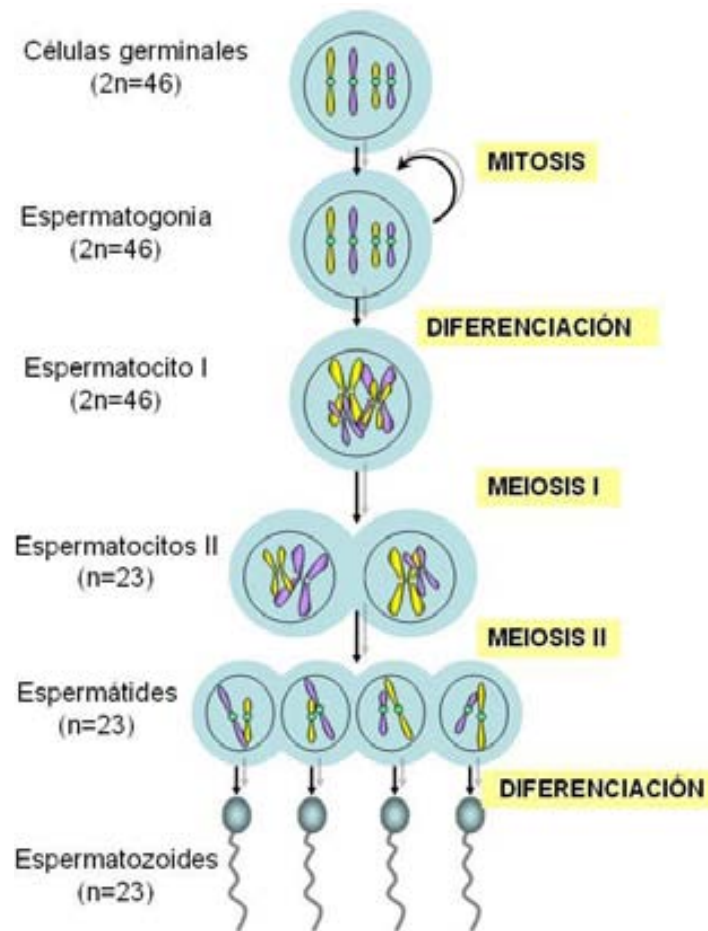


Figura 1. Representación gráfica de los principales procesos celulares que se producen durante la espermatogénesis

Durante la meiosis, además, se produce el fenómeno de recombinación homóloga. Este proceso es el responsable de la variabilidad genética y consiste en el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos durante la profase I de la meiosis I.

La célula haploide que resulta tras finalizar la meiosis recibe el nombre de espermatida. Durante la espermiogénesis las espermatidas sufren un proceso de diferenciación y especialización celular que deriva en la formación de espermatozoides maduros. En esta fase la espermatida experimenta modificaciones que le van a aportar las capacidades específicas que caracterizan al espermatozoide y que le van a permitir independizarse del túbulo seminífero, adquirir el potencial de fertilización, ser capaz de desplazarse a través del tracto reproductor femenino y finalmente fertilizar al ovocito.

1.2. El ADN espermático

Principalmente, cualquier célula eucariota contiene dos tipos de ADN, el ADN nuclear (ADNn) y el ADN mitocondrial (ADNmt). Mientras que la fragmentación del ADNn se ha investigado más extensamente y existen numerosos trabajos que demuestran su asociación con fallos de FIV o en inseminación intrauterina (IIU) (Duran y col., 2002), (Sun y col.,1997; Morris y col.,2002; Henkel y col.,2004) e ICSI (Lopes y col.,1998; Henkel y col.,2003; Lewis y col.,2004), la investigación del daño producido en el ADN mitocondrial (ADNmt), así como su función en el espermatozoide y su relación con la fertilización y el embarazo no se ha estudiado de una forma tan exhaustiva.

1.2.1 ADN nuclear: estructura y organización

La cromatina espermática es diferente en composición y organización que la cromatina nuclear de las células somáticas. Mientras que el ADN de cualquier tipo celular se encuentra asociado a proteínas básicas llamadas histonas, en el espermatozoide, las histonas son reemplazadas casi en su totalidad (en humanos en un 85%) por unas proteínas de transición primero y casi inmediatamente después por otro tipo de pequeñas proteínas llamadas protaminas. Como consecuencia, el ADN contenido en el núcleo espermático se encuentra en un estado de compactación tal que se estima que es al menos 6 veces mayor que en los cromosomas mitóticos (Fuentes-Mascorro y col., 2000).

Dado que la compactación del ADN en el interior del núcleo espermático constituye un punto crítico en la etiología de la fragmentación del ADN, a continuación se mencionan diferentes aspectos clave relacionados con la estructura nuclear espermática.

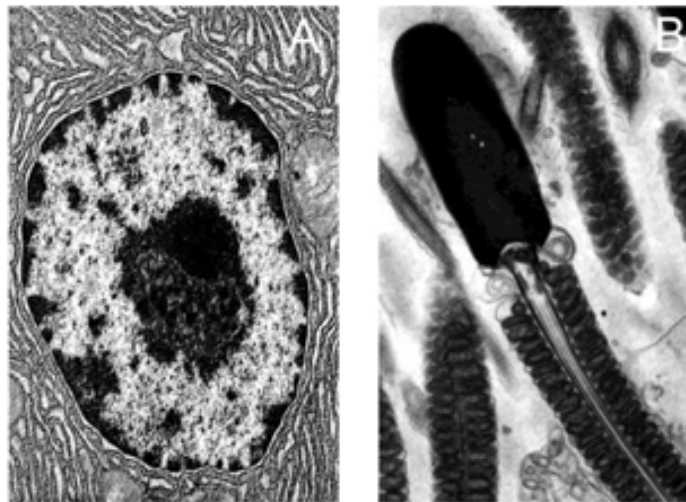


Figura 2. Microscopía electrónica en la que se muestra el diferente grado de compactación nuclear en A: célula somática, cromatina constituida por ADN unido a histonas y, B: espermatozoide, cromatina constituida por ADN unido a protaminas.

En los últimos años, el concepto que se tenía sobre la estabilidad del genoma en el espermatozoide ha ido experimentado un cambio progresivo. Históricamente, la cromatina espermática se consideraba una estructura altamente compacta y completamente inerte a cualquier agente físico o bioquímico (Ward, 1993). Sin embargo, actualmente se sabe que, especialmente en pacientes infértiles, la cromatina espermática es susceptible de perder parte de su inaccesibilidad y en consecuencia, de incrementar la vulnerabilidad del ADN frente a agentes dañinos (de Iuliis y col., 2009). Numerosos estudios ponen de manifiesto la alta complejidad del proceso espermatogénico así como la extremada sensibilidad a factores externos que pueden contribuir a generar espermatozoides con una estructura cromatínica deficiente (McPherson y Longo, 1992; Agarwal y Saleh, 2002).

Para entender los mecanismos por los que el ADN espermático se fragmenta es necesario saber cómo se encuentra empaquetado en el interior del núcleo espermático, así como las diferencias que presenta respecto el ADN nuclear de células somáticas. Aunque todavía hay bastante incógnitas sobre diferentes aspectos mecánicos y topológicos del proceso en cuestión, el modelo actual de empaquetamiento Barrat y col., (2010) considera cuatro puntos principales. El primero es el proceso de unión de las protaminas al ADN, en sustitución de las histonas. Las protaminas son pequeñas proteínas cargadas positivamente y ricas en residuos cisteína capaces de formar puentes disulfuro que proporcionan estabilidad a la estructura final de la cromatina. La principal función de las protaminas parece estar ligada a proporcionar protección mecánica ante los diversos factores que puedan dañar al ADN (Oliva, 2006). Para ello, las protaminas se unen al ADN y lo compactan con una gran eficacia intercalándose en el surco mayor desde el inicio hasta el final del ADN (Balhorn, 1982). Al estar cargadas positivamente, neutralizan las cargas negativas de los grupos fosfato transformando el ADN en una especie de polímero sin carga

(Balhorn, 1982). Las protaminas empaquetan el ADN en unas estructuras altamente compactas llamadas toroides. Cada toroide contiene aproximadamente unos 50 Kb de ADN (Hud y col., 1993).

Aunque no se conoce exactamente como se forman estas estructuras toroidales, podrían ser fruto de un fenómeno de simple auto-organización pasiva que en última instancia dependería de las características físico-químicas que resultan del tándem molecular ADN-protaminas. Recientes estudios apoyan esta hipótesis al demostrar que es posible formar *in vitro* estructuras toroidales simplemente añadiendo protaminas al ADN (Brewer y col., 1999 y 2003).

Un segundo punto a tratar surge de la observación de que el ADN unido a protaminas presenta un menor grado de superenrollamiento que el observado en el ADN de las células somáticas (Ward 1993; 1989). El superenrollamiento se produce cuando la molécula de ADN bicatenario se retuerce o gira sobre sí misma, de tal modo que el eje de la doble hélice propia del ADN no sigue una curva plana sino que forma otra hélice, una superhélice. Este grado de superenrollamiento puede suponer un impedimento a la compactación. Este problema se soluciona mediante la acción de las enzimas topoisomerasas, dado que éstas pueden cortar el ADN para permitir que la tensión estructural de la molécula se relaje. De esta forma se consigue que las protaminas puedan acceder al ADN y reemplazar a las histonas. (McPherson and Longo, 1993).

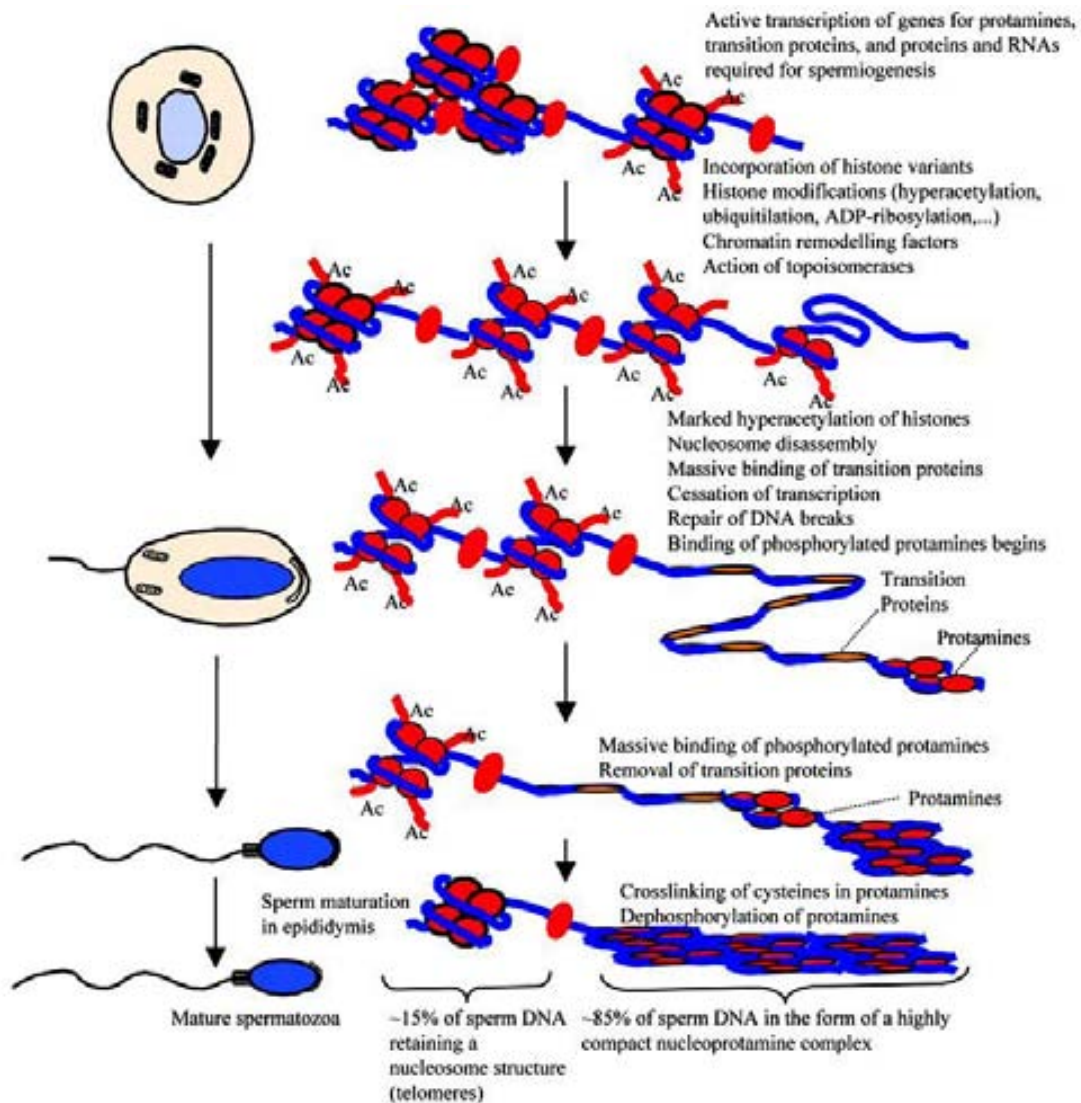


Figura 3. Representación esquemática de los principales sucesos ocurridos durante el reemplazo de histonas por protaminas. Adaptado de Oliva R Hum. Reprod. Update 2006;12:417-435

El tercer aspecto importante reside en el hecho de que algunas histonas no son completamente reemplazadas por las protaminas y permanecen en el espermatozoide maduro. Este punto ha supuesto todo tipo de hipótesis sobre la función específica que pudieran tener en el espermatozoide maduro las secuencias del ADN que permanecen

unidas a histonas. Una posibilidad es que estas secuencias tengan algún tipo de actividad transcripcional. Algunos autores han sugerido que estas regiones de ADN unido a histonas se corresponde con los telómeros (Zalensky y col., 2002) mientras que otros sugieren que estas regiones se corresponden con dominios de unión del ADN con la matriz nuclear comúnmente llamadas regiones MAR del inglés *Matrix Attachment Regions* (Pittoggi y col., 2000; Wykes and Krawetz, 2003). Independientemente de que las regiones unidas a histonas puedan tener o no una función decisiva en la fecundación o incluso en el correcto desarrollo embrionario, lo cierto es que el ADN unido a histonas es mucho más susceptible a dañarse que el ADN unido a protaminas. En consecuencia, alteraciones en el proceso de sustitución de las histonas que causen una mayor proporción de histonas retenidas, especialmente en situaciones patológicas, supondrá una mayor susceptibilidad a que se produzca una fragmentación del ADN (de Iuliis y col., 2009).

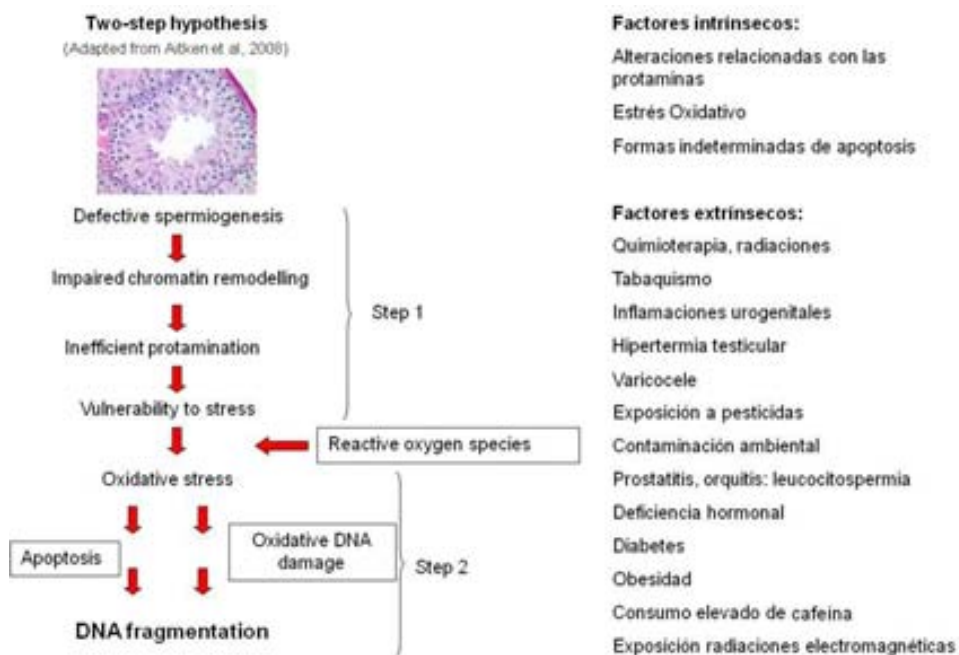


Figura 4. Esquema ilustrativo sobre el origen del daño en el ADN espermático. Adaptado de Aitken R, De Iuliis G Mol. Hum. Reprod. 2010;16:3-13

Por último, en cuarto lugar, subrayar que no existe un modelo de cómo los toroides de protaminas se organizan hasta dar lugar a la estructura final de la cromatina espermática. Sin embargo, sí que es conocido que esta cromatina se organiza en diferentes dominios con forma de lazos o *loops* sobre una matriz nuclear (Sotolongo y Ward 2000). Interesantemente, estos lazos de ADN comprenden 50 kbases, el mismo número de pares de bases que forman los toroides antes mencionados. Esto ha permitido desarrollar un modelo para explicar la estructura de la cromatina espermática en el cual cada estructura toroidal empaqueta uno de estos lazos de ADN (Sotolongo y col.,2003). Este modelo sugiere que cada toroide está unido a la matriz nuclear por una secuencia de ADN que permanece asociada a histonas y que es altamente sensible a agentes enzimáticos tales como la DNasa I.

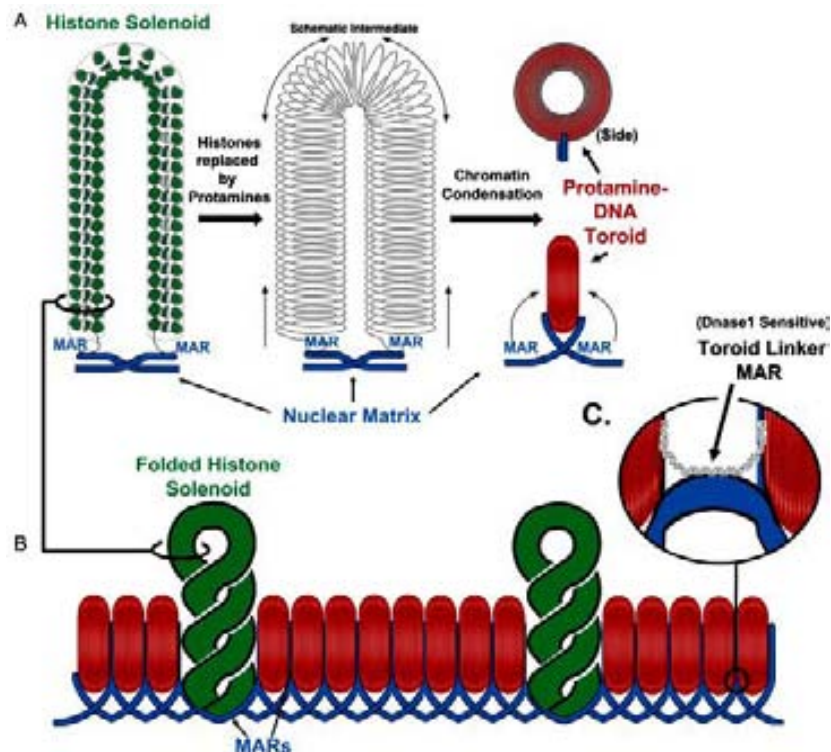


Figura 5. Principales elementos estructurales de la cromatina espermática: Regiones MAR (Matrix Attach Regions), matriz nuclear y toroides Ward W S Mol. Hum. Reprod. 2010;16:30-36

En cuanto al orden de los acontecimientos que conducen a la formación del núcleo espermático y según el modelo de organización de la cromatina de Ward y Coffey (1991), se distinguen igualmente cuatro acontecimientos o niveles de organización: (i) anclaje de los cromosomas en el anillo nuclear, (ii) formación de los bucles de ADN, (iii) sustitución de las histonas por protaminas y (iv) reposicionamiento de los cromosomas y organización dentro de la matriz. Se desconocen los mecanismos exactos por los que el ADN espermático consigue empaquetarse en un volumen tan reducido y con una organización que no parece trivial. En efecto, algunos autores apuntan la existencia de una arquitectura determinada y la existencia incluso de dominios cromosómicos específicos (Mudrak y col., 2006). Según el modelo de Mudrak, los cromosomas se posicionarían con los centrómeros hacia el interior y los telómeros, formando dímeros, dirigidos hacia el exterior.

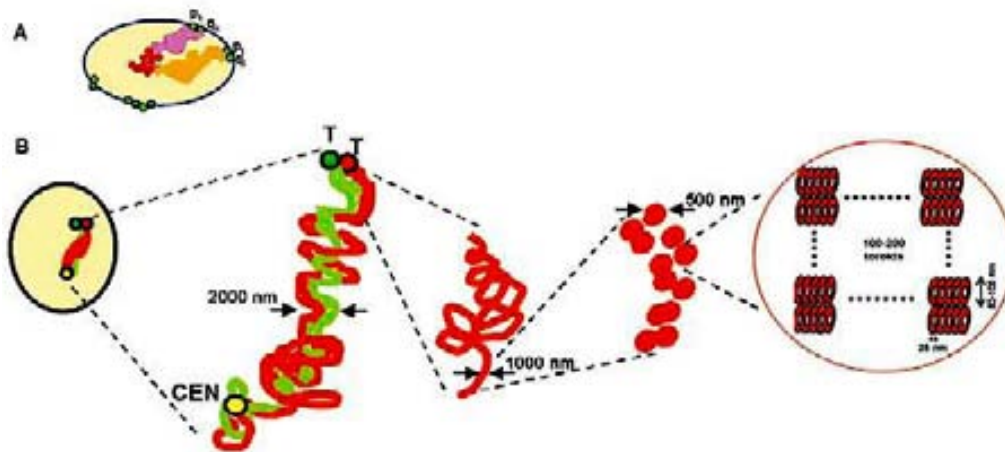


Figura 6. Modelo de organización cromosómica nuclear en espermatozoide humano propuesto sobre la localización de los centrómeros y telómeros. Los centrómeros se sitúan en el interior del núcleo mientras que los telómeros forman dímeros asociados a la membrana nuclear. Mudrak O et al. J Cell Sci 2005;118:4541-4550

Como consecuencia de todo este proceso, el espermatozoide consigue un nivel de compactación y protección del ADN ante posibles agresiones externas mucho mayor que en células somáticas pero también otras ventajas, como un diseño aerodinámico que optimiza así su capacidad de desplazamiento. A nivel epigenético, diversos estudios apuntan a que la compactación del núcleo mediante protaminas juega un papel importante en el silenciamiento de los genes del genoma y en la posterior reprogramación de la impronta genética del ADN espermático (Aoki y Carrell, 2003).

1.2.2. ADN mitocondrial

En el espermatozoide, las mitocondrias se localizan en la pieza intermedia. Al igual que en las mitocondrias de las células somáticas, la secuencia del ADNmt contiene genes que codifican para 13 polipéptidos esenciales para la cadena de transferencia de electrones situada en la membrana mitocondrial interna, más 22 ARNt y 2 ARNr que son necesarios para la expresión del ARNm de los polipéptidos mencionados (Anderson y col., 1981).

Estos polipéptidos están estrechamente involucrados en la producción de ATP en la mitocondria. En el caso del espermatozoide, la energía generada se utiliza para impulsar el flagelo de tal modo que el espermatozoide pueda desplazarse y así conseguir alcanzar el ovocito. No obstante, como subproducto del proceso de producción de energía las mitocondrias generan la mayoría de las ERO (Especies Reactivas de Oxígeno) endógenas de tal manera que sobre el 1-5% del oxígeno consumido se convierte en radicales libres (Chance y col., 1979). Al final, la producción descontrolada de ERO no sólo daña la mitocondria, sino que también daña al ADN mitocondrial, lo cual conlleva una disminución en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Kasai y col., 2002). Esta disminución

del potencial de membrana ha sido correlacionada negativamente con el estrés oxidativo seminal (Wang y col., 2003). La disfunción mitocondrial, además de causar un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, también activa la apoptosis por la vía intrínseca o mitocondrial (Schulze-Osthoff y col.,1992; Heerdt y col.,1998). Por todo ello, se ha sugerido que el potencial de membrana mitocondrial es un parámetro muy sensible de calidad espermática (Marchetti y col., 2002) que, además, se relaciona con la fragmentación del ADN a través de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

Al contrario que el ADN nuclear, el ADN mitocondrial no está protegido por las histonas y protaminas, se replica de una forma muy rápida y sólo tiene un mecanismo de reparación muy básico (Croteau y col., 1999). Por todo ello, ciertas regiones del genoma mitocondrial son hasta 100 veces más susceptibles a dañarse (Pesole y col., 1999). Por lo tanto, el ADNmt es particularmente propenso a las mutaciones y se ha asociado a numerosas enfermedades, algunas relacionadas con la infertilidad masculina tales como la astenozoospermia o la oligoastenozoospermia (Folgerø y col.,1993; Lestienne y col.,1997).

Teniendo en cuenta que los genes presentes en el ADNmt codifican para unas proteínas cuya función está relacionada con la fosforilación oxidativa y la producción de ATP en la mitocondria, cabe considerar que los defectos de ADNmt conllevan inevitablemente en una disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y a una subsecuente afectación en la motilidad de los espermatozoides (Kasai y col., 2002; Henkel y col., 2011). Es por esto que la determinación del $\Delta\psi_m$ haya sido sugerido como un parámetro muy sensible de calidad espermática (Marchetti y col., 2002). Es interesante resaltar que la incubación de los espermatozoides obtenidos de pacientes infértiles con 2,5 mM de ATP durante 1 hora mejora significativamente la capacidad de los espermatozoides para fertilizar *in vitro* (Rossato y col., 1999).

Finalmente, como las mitocondrias también están implicados en la regulación de la apoptosis a través de la vía llamada mitocondrial o intrínseca (Gogvadze y Orrenius, 2006), el daño producido en el ADNmt puede provocar disfunciones de la cadena respiratoria, como la generación de ERO. Con el tiempo, estos procesos pueden dar lugar a la inducción de la apoptosis que terminen produciendo fragmentación del ADN nuclear. Por lo tanto, existe la posibilidad de que el daño mitocondrial causado por un estímulo extracelular como una infección o inflamación puede desencadenar la producción anómala de ERO desde la mitocondria en unas concentraciones elevadas que pueden llegar a provocar daños en el ADN nuclear. La producción de ERO por parte de los espermatozoides ha demostrado tener un mayor potencial de daño en el ADN nuclear del propio espermatozoide que las ERO de origen extrínseco derivadas de los leucocitos (Henkel y col., 2005).

1.3. Fragmentación del ADN espermático

Ante la necesidad de incorporar en la práctica clínica test diagnósticos más precisos y con una mayor fiabilidad a la hora de diagnosticar infertilidad de origen masculino, diferentes investigaciones han focalizado su interés en algunas de las estructuras que son determinantes para la buena funcionalidad del espermatozoide. Pero sin duda, la fragmentación del ADN ha sido, y está siendo, el parámetro que ha despertado más interés entre los especialistas a raíz de la multitud de estudios científicos que lo avalan como marcador de calidad espermática e infertilidad.

Por fragmentación del ADN espermático se entiende el conjunto de alteraciones que pueden ocasionar las roturas en la doble hélice, principalmente roturas de una (ADNss) o doble cadena (ADNds), así como aquellas alteraciones que impliquen modificaciones de

bases nitrogenadas, formación de aductos, o fenómenos de cross-linking entre ADN o proteínas que pueden inducir la formación de nuevas roturas de ADN (Barrat y col., 2010) Todas estas alteraciones pueden estar presentes en espermatozoides de individuos con seminogramas normales, con graves consecuencias tanto en el contexto de la fecundación natural como en el de la reproducción asistida.

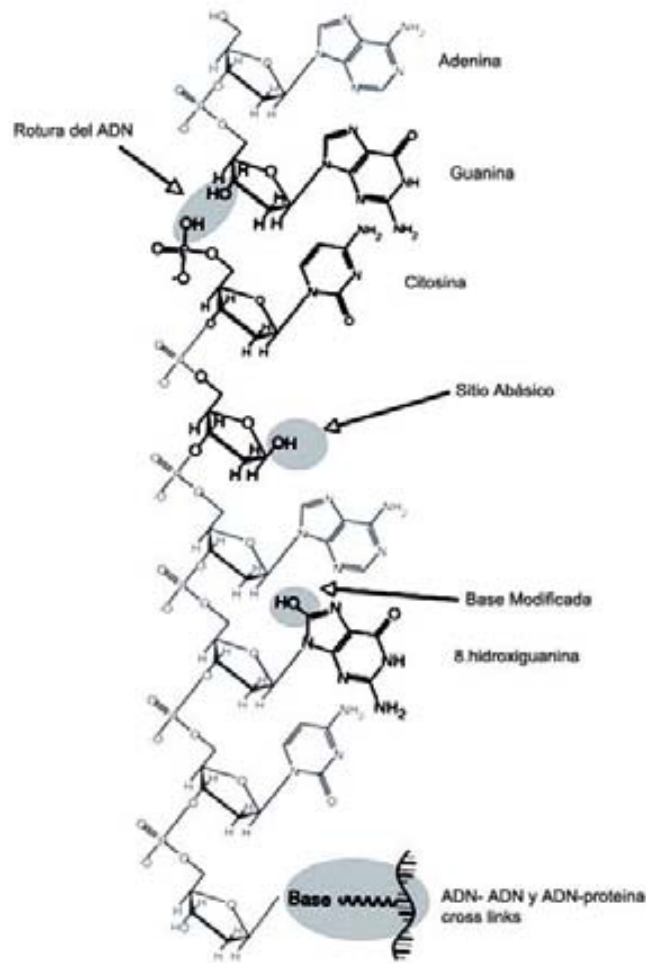


Figura 7. Tipos de daño o alteraciones que pueden producirse en la molécula del ADN

Esto se debe a que los espermatozoides con el ADN fragmentado son capaces de fertilizar ovocitos (Twiggy y col., 1998; Henkel y col., 2004) dando lugar a embriones que, dependiendo del grado de daño en el que el genoma paterno haya incurrido, pueden sufrir alteraciones durante su desarrollo que comprometan su viabilidad (Qiu y col., 1995; Seli y col., 2004).

El método de inseminación de ovocitos conocido como *Intracytoplasmic Sperm Injection* (ICSI) es un método de reproducción asistida que se salta todas las barreras fisiológicas de modo que espermatozoides genéticamente dañados también pueden fertilizar un ovocito. Las roturas no reparadas en el ADN de espermatozoides utilizados en tratamientos ICSI podrían conllevar un aumento de los riesgos para los bebés nacidos mediante este método. Estos riesgos pueden materializarse en forma de un aumento de anomalías cromosómicas, pequeños o grandes defectos de nacimiento o incluso cáncer en la infancia en base a los estudios realizados por diversos autores. (In't Veld y col., 1995; Kurinczuk y Bower, 1997; Ji y col., 1997; Aitken y col., 1998; Aitken y Krausz, 2001; Aitken y Sawyer, 2003).

Dado que cada vez más estudios ponen de manifiesto la importancia de determinar la integridad del ADN espermático a la hora de establecer el potencial fértil de un individuo, este parámetro está siendo objeto de un intenso debate acerca del valor que tiene para primero diagnosticar y después tratar o asesorar a los pacientes (Barrat y col., 2010). El consenso actual parece indicar que la determinación del ADN espermático se consolida como una herramienta eficaz en los laboratorios de andrología y que, junto al tradicional seminograma, proporciona una valoración de la calidad espermática del paciente y de su potencial fértil. No obstante, es cierto que la capacidad de reparación del ADN por parte del

ovocito también puede interferir en el diagnóstico al corregir dichas roturas y dar lugar a un nuevo individuo. En este sentido es importante señalar la necesidad de realizar estudios fisiológicos y moleculares en los que se pueda evaluar de alguna forma la capacidad de reparación del ADN espermático, ya sean roturas de cadena simple o doble, por parte del ovocito.

1.3.1. Causas de fragmentación del ADN espermático nuclear

La fragmentación del ADN espermático tiene su origen en un conjunto de diferentes factores que pueden darse de forma individual o conjunta de modo que unos factores pueden influir sobre otros. Principalmente, destacan la apoptosis o pseudo-apoptosis (*apoptosis-like*), proceso en el que la activación de nucleasas espermáticas podría dañar la integridad del ADN (Sakkas y col., 1999; Sakkas y col., 2002), así como alteraciones de la maduración que provoquen un deficiente empaquetamiento del ADN (McPherson y Longo, 1992) y, por consiguiente, una mayor vulnerabilidad al estrés oxidativo (Agarwal y Saleh, 2002; Xu y col., 2003). Otros factores de carácter extrínseco, como son el estilo de vida o determinados factores ambientales, también pueden ejercer un impacto negativo en la calidad del ADN espermático (Fraga y col., 1996; Sepaniak y col., 2006; Kort y col., 2006 ; Hauser y col., 2007; Meeker y col., 2008).

A continuación se exponen los principales agentes, mecanismos y conductas que se consideran más relevantes, ya sea de un modo directo o indirecto, en la generación de roturas en el ADN espermático.

1.3.1.1. Estrés Oxidativo

Una de las principales causas de la fragmentación del ADN es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Sharma y Agarwal, 1996; Garrido y col., 2004). Diversos estudios calculan que entre un 25-40% de los hombres infértiles presentan en semen concentraciones elevadas de ERO (Iwasaki y Gagnon, 1992; de Lamirande y Gagnon, 1995), porcentaje que se incrementa hasta un 96% en pacientes que han sufrido lesiones de la médula espinal (Padrón y col., 1997). Sin embargo, las ERO son esenciales porque participan en determinados procesos y funciones celulares (Halliwell, 2000). En el espermatozoide, por ejemplo, las ERO son fundamentales para que se produzca la capacitación y reacción acrosómica (de Lamirande y Gagnon, 1993; Aitken y col., 1995). En condiciones normales, los agentes oxidantes y antioxidantes se encuentran en un estado de equilibrio dinámico regulado por el sistema glutatión peroxidasa/glutatión reductasa. La glutatión reductasa es una enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido el cual sirve de sustrato a la glutatión peroxidasa para la reducción de peróxidos y lipoperóxidos. Cuando se produce un desequilibrio a favor de los agentes oxidantes, la célula puede ver afectada la integridad de su membrana plasmática y el ADN. A esta condición se le conoce como "estrés oxidativo" (Sies, 1985).

El estrés oxidativo puede causar diferentes tipos de daños en el ADN, como modificaciones de bases, la pérdida de una base para crear un sitio abásico, roturas en el ADN, tanto de cadena simple como de cadena doble, o incluso *cross-linking* intra-cadena o ADN-proteína (Croteau y Bohr, 1997; Aitken y col., 2009). La 8-hidroxilación de la guanina (8-OHdG) constituye uno de los marcadores más sensibles y abundantes de daño en el ADN inducido por estrés oxidativo (Shen y col., 1999). La presencia de cantidades

elevadas de 8-OHdG se ha relacionado con la infertilidad masculina (Kodama y col., 1997; Shen y col., 1999). Si el nivel de 8-OHdG se mantiene elevado, puede ser mutagénico y puede causar la pérdida embrionaria, malformaciones o cáncer infantil (Fraga y col., 1991; Loft y col., 2003). Un segundo tipo de daño, que es irreversible, se manifiesta mediante la fragmentación del ADN de doble cadena (Cui y col., 2000). En última instancia, esto conducirá a errores en la transcripción y la traducción (Cooke y col., 2003).

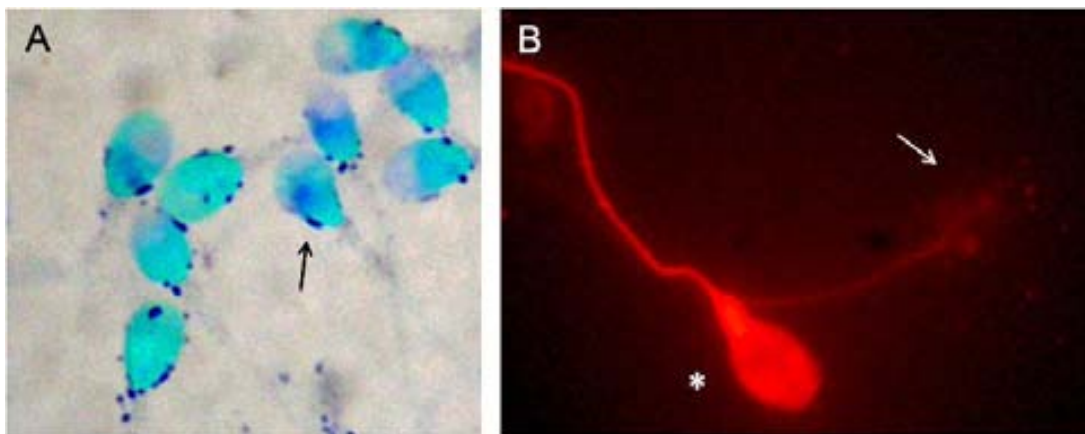


Figura 8. Estrés oxidativo en espermatozoides humanos. A) Precipitados de sal de tetrazolio al reaccionar con el ión superóxido (flecha); B) 8-OHdG detectado mediante Inmuncitofluorescencia (*). Espermatozoide negativo para 8-OHdG (flecha).

El daño en el ADN por estrés oxidativo puede producirse bien de forma indirecta induciendo apoptosis en células somáticas (Huang y col., 2000) o bien de forma directa cuando la célula produce ella misma grandes cantidades de ERO (Gorczyca y col., 1993). Este último sería el caso de los espermatozoides inmaduros. Éstos son los principales productores de las ERO causantes de la fragmentación del ADN espermático (Saleh y col., 2002; Henkel y col., 2005). Los datos que apoyan esta teoría se derivan de estudios que

demuestran un aumento en los niveles de las formas específicas de daño oxidativo, como la 8-OHdG en el ADN de estos espermatozoides (Shen y Ong, 2000).

1.3.1.2. Apoptosis Abortiva

Aproximadamente el 75% de los 200 millones de células germinales que se producen diariamente en el hombre se eliminan por medio de la apoptosis (Huckins, 1978). Esta masiva eliminación de células germinales se considera como un paso importante para la progresión normal de la espermatogénesis en el adulto (Orth y col., 1988) y está controlada por las células de Sertoli, las cuales sólo pueden sustentar un número limitado de células germinales (Russell y Peterson, 1984). De este modo, al llegar a la pubertad, se establece una relación estable entre las células de Sertoli y las células germinales pre-y post-meióticas. Esta relación favorece el control de calidad que requiere la espermatogénesis y asegura, mediante la apoptosis que actúa como un mecanismo de regulación finamente equilibrado, la eliminación de células sobrantes o alteradas (Braun, 1998).

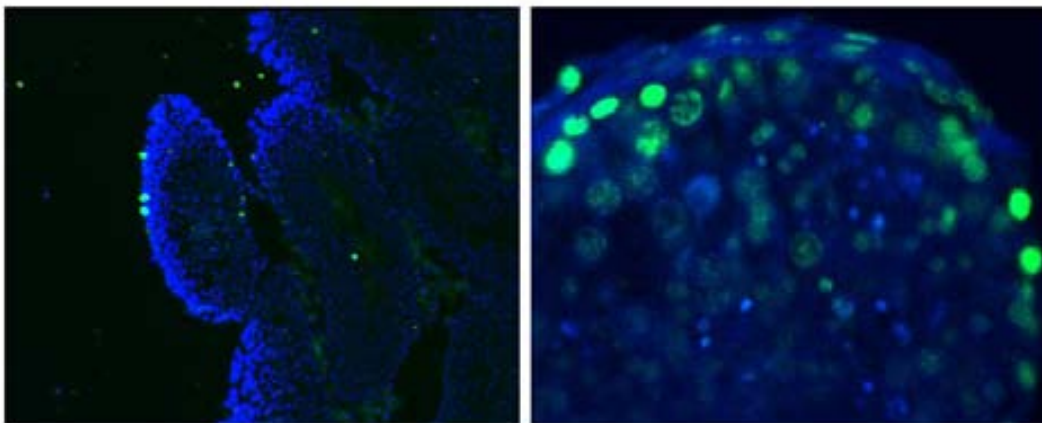


Figura 9. Detección de células apoptóticas (verde) mediante el sistema TUNEL en corte histológico de testículo de ratón (derecha) y un portador de un polimorfismo de heterocromatina pericentromérica del cromosoma 9 (9qh+++). La señal verde indica las células apoptóticas o aquellas que presentan roturas en su ADN. Contraste DAPI.

En el proceso de eliminación de las células germinales, el sistema Fas/FasL juega un papel relevante ya que las células que van a ser eliminadas expresan este marcador, mientras que las células de Sertoli expresan el ligando (FasL) (Lee y col., 1997; Eguchi y col., 2002). La unión Fas/FasL desencadena la apoptosis en la célula germinal, la cual es fagocitada posteriormente por las células de Sertoli. Sin embargo, si este mecanismo no funciona correctamente, pueden aparecer en el eyaculado espermatozoides que expresan Fas en su membrana plasmática. En base a esto, Sakkas y col., (1999) sugirió una hipótesis según la cual algunos espermatozoides destinados a entrar en apoptosis escapan de este proceso debido a algún tipo de alteración en el mecanismo Fas/FasL o por estar saturada la capacidad de las células de Sertoli de fagocitar estas células. Esta hipótesis se conoce como "apoptosis abortiva", aunque se desconoce el mecanismo molecular de cómo un espermatozoide Fas-positivo evita la apoptosis. No obstante, actualmente se cree que la expresión de Fas en el espermatozoide eyaculado humano no contribuye a la infertilidad masculina ya que estos espermatozoides no son capaces de iniciar la apoptosis (Lachaud y col., 2004). Otros estudios demuestran que la expresión de Fas no se relaciona con el daño en el ADN (McVicar y col., 2004) ni con la tasa de fertilización o de embarazo. Sin embargo, la idea de la apoptosis abortiva se relacionaría con la vía mitocondrial o intrínseca y no con la vía extrínseca: el estrés oxidativo mitocondrial activaría caspasas y en última instancia nucleasas espermáticas que digerirían el ADN accesible.

1.3.1.3. Activación de caspasas y endonucleasas

En algunas especies, los espermatozoides tienen la capacidad de internalizar fragmentos de ADN exógeno (Lavitrano y col., 1992). Esta internalización activa enzimas endonucleasas del espermatozoide (Maione y col., 1997), las cuales podrían dañar el ADN del propio espermatozoide, desencadenando la apoptosis y, en última instancia, produciendo la muerte del mismo. En experimentos realizados con ratones, se ha visto que la activación de nucleasas en presencia de ADN exógeno produce daño en el ADN espermático, lo que provoca una menor calidad del embrión y una reducción en las tasas totales de implantación mediante ICSI (Pérez-Crespo y col., 2008). Todavía no está claro que este proceso tenga un papel relevante en espermatozoides humanos. No se descarta que ocurra, puesto que la compactación del núcleo del espermatozoide humano es mucho menos homogéneo al retener un mayor número de histonas (entre un 15 y un 20% más que en el ratón) y, en consecuencia, el ADN es más susceptible a sufrir daño por actividad nucleasa endógena (Bianchi y col., 1993).

1.3.1.4. Alteraciones en el empaquetamiento de la cromatina

Durante la espermiogénesis se lleva a cabo la elongación de la espermátide. Durante esta transformación morfológica y bioquímica, el espermatozoide va adquiriendo sus características morfológicas propias. A nivel de morfología nuclear y con la finalidad de proteger el genoma paterno de agresiones externas, el núcleo de las células germinales masculinas experimenta una notable condensación de la cromatina en dos fases, una fase testicular en la cual las histonas se sustituyen por proteínas de transición y estas por

protaminas (Poccia, 1986) y después una segunda fase en el epidídimo, en donde las protaminas establecen entre ellas puentes disulfuro compactando firmemente el ADN. Durante este proceso es necesario que unas determinadas enzimas topoisomerasas realicen roturas en el ADN para poder reorganizar el núcleo espermático. Si los cortes que se producen en este proceso no se reparan por exceso de actividad de topo II o por la falta de inhibidores de topo II (Bizzaro y col., 2000), se produce una maduración incompleta que resulta en una condensación de la cromatina alterada. La presencia de una baja protaminación o una relación anormal de la relación de protamina 1 protamina 2 (P1/P2 ratio) es indicativo de una maduración incompleta y se ha correlacionado con fragmentación en el ADN. Por otra parte, otros estudios han asociado alteraciones en la relación P1/P2 con una menor capacidad de fertilización en diferentes ciclos de FIV e ICSI (Torregrosa y col., 2006).

1.3.1.5. Infecciones / inflamaciones

Son una de las principales causas corregibles de infertilidad masculina. Se estima que puede representar hasta el 35% de los pacientes que consultan por infertilidad (Henkel y col., 2007). Por lo general, las infecciones del tracto genital son procesos patológicos que suelen cursar con inflamación y, en consecuencia, inducen la activación de los leucocitos en el tracto seminal. Esto conduce a un incremento significativo de los niveles de estrés oxidativo con el consiguiente daño celular en la movilidad o la reacción acrosómica al quedar dañadas las membranas mitocondrial y plasmática (Eggert-Kruse y col., 2007;), e incluso en el ADN, tal y como se ha observado en muestras de semen de pacientes diagnosticados de leucocitospermia (Álvarez y col.,(2002). A todo esto, hay que añadir el

daño producido por la acción directa de los patógenos sobre las células germinales masculinas (Monga y Roberts, 1994). En concreto, las infecciones del tracto urogenital suelen provocar una reducción de la motilidad espermática (Diemer y col.,2003). No está claro aún si las alteraciones detectadas son provocadas por la influencia directa de las bacterias patógenas en los espermatozoides o mediante el estrés oxidativo que media en el proceso inflamatorio (Fraczek y col., 2007). Sea como fuera, y dado que los espermatozoides apenas disponen de mecanismos de defensa antioxidantes y dependen de la protección antioxidante proporcionada por el plasma seminal (Lewis y col., 1997), la exposición a las ERO producidas por los leucocitos supone un estrés oxidativo adicional. Por otra parte, el estrés oxidativo causado por procesos infecciosos o inflamatorios puede conducir a daño mitocondrial, lo que explicaría la reducción en la movilidad espermática. Por lo tanto, las infecciones del tracto genital masculino podrían tener efectos subyacentes en algunas enfermedades de tipo mitocondrial, aunque los estudios clínicos que investigan la relación entre la infección del tracto genital masculino y el daño mitocondrial no son concluyentes.

1.3.1.6. Quimioterapia y radioterapia

Los tratamientos con efectos citotóxicos como la quimioterapia y la radioterapia tienen un efecto deletéreo en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos (Howell y Shalet, 2001). En comparación con las células somáticas e incluso las células de Leydig que son capaces de soportar dosis de radiación de hasta 20 Gy y 30 Gy en niños prepúberes y en hombres adultos, respectivamente (Shalet y col., 1989), el epitelio germinal de los túbulos seminíferos es extremadamente sensible a la radiación de forma que aquellas dosis de

radiación superiores pueden causar infertilidad permanente (Centola y col., 1994). Así pues, dependiendo del tipo de procedimiento, dosis y edad del paciente, el tratamiento contra el cáncer suele producir una alta tasa de azoospermia debido a la ablación del epitelio germinal.

Por otra parte, cabe la posibilidad de que, como consecuencia del tratamiento, se produzcan mutaciones en la línea germinal que puedan pasar a la descendencia en aquellos individuos que a pesar de la enfermedad y la terapia recibida, hayan logrado reproducirse (Brinkworth, 2000). Otros estudios han demostrado una clara susceptibilidad a la carcinogénesis transgeracional en la descendencia de estos individuos (Hoyes y col., 2001). También se han encontrado unos porcentajes anómalos de espermatozoides con fragmentación del ADN en pacientes con cáncer tras ser sometidos al tratamiento (Chatterjee y col., 2000). Por todo esto, resulta esencial asesorar al paciente oncológico sobre los potenciales riesgos citotóxicos y mutagénicos que el tratamiento del cáncer puede ejercer en su capacidad reproductiva así como el riesgo de carcinogénesis para la descendencia.

1.3.1.7. Exposición a tóxicos

Es otro factor que se ha asociado a la fragmentación del ADN espermático y el desarrollo de infertilidad. Existen fuertes evidencias de que la exposición a determinadas sustancias químicas tales como disolventes, humos de soldadura, epoxi y resinas fenólicas, metales pesados o gasolina procedentes de diferentes industrias (química, pintura, impresión electrónica, o las industrias de vehículos de motor) pueden causar cáncer transgeneracional (Wilkins y Hundley, 1990). Incluso se ha demostrado que los

contaminantes del tráfico, tales como monóxido de plomo, óxidos de azufre o de carbono, inciden negativamente en la motilidad espermática (De Rosa y col., 2003).

Últimamente, diversos estudios han puesto de manifiesto la relación que existe entre la exposición de algunos de estos tóxicos individuales con la fragmentación del ADN. Estos estudios sugieren también mecanismos a través de los cuales se produce esta fragmentación. Ejemplos de sustancias químicas que causan daño del ADN espermático es el estireno (monómero importante para producir plásticos, caucho sintético o poliéster) (Migliore y col., 2002), el fenvalerato (insecticida piretroide sintético) (Bian y col., 2004), los pesticidas organofosforados (Sánchez-Peña y col., 2004) o la exposición de metales pesados como el cadmio o el plomo. La mayoría de estas sustancias son mutágenas o causantes directas de un desequilibrio en el sistema corporal redox. El daño puede incluso ser inducido y fijado en concentraciones subtóxicas de estas sustancias, porque las células germinales postmeióticas son muy sensibles a la inducción de daño en el ADN (Fabricant y col., 1983).

1.3.1.8. Estilo de vida

Se trata de un factor importante que contribuye significativamente a la infertilidad masculina. Tienen efectos perjudiciales sobre la fertilidad masculina el consumo de tabaco, el abuso de drogas (Vine, 1996), el alcohol, el consumo de cafeína (Anderson y col., 2010) y el estrés psicológico (Zorn y col., 2008). Para el consumo de alcohol y la cafeína, los efectos parecen ser dosis-dependiente.

Además, la falta de ciertos micronutrientes como las vitaminas B, ácido fólico, el cinc o elementos de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados parece contribuir a la

infertilidad masculina (Anderson y col., 2010). Por otra parte, según las evidencias aportadas por algunos autores (Paasch y col., 2010) y edad (Vagnini y col., 2007), la obesidad también podría tener un impacto adverso sobre la fertilidad masculina.

1.3.1.9. Radiación electromagnética

La radiación electromagnética y la exposición del escroto al calor también son factores asociados al estilo de vida. Las ondas electromagnéticas generadas por los teléfonos celulares son extremadamente bajas, de manera que la radiación de teléfonos celulares no es capaz de ionizar las moléculas orgánicas (Agarwal y col., 2008a). Sin embargo, otros estudios han indicado efectos perjudiciales de la radiación del teléfono móvil en el recuento espermático, la movilidad, viabilidad y morfología normal del espermatozoide que depende de la intensidad del uso del teléfono móvil (Agarwal y col., 2008b). Otros estudios más recientes (De Iuliis y col., 2009) encuentran una asociación entre el estrés oxidativo inducido por ondas electromagnéticas de los teléfonos celulares, que no sólo afecta a las membranas plasmáticas de los espermatozoides y provoca una disminución de la capacidad antioxidante, sino que también aumenta la producción mitocondrial de ERO y la formación de aductos de ADN que en última instancia producen fragmentación del ADN.

Aunque el mecanismo de daño establecido por la radiación electromagnética de teléfonos celulares no está claro y teniendo en cuenta que la ionización de las moléculas es poco probable debido a las bajas frecuencias utilizadas, los efectos térmicos y "microondas" son motivo de debate (Deepinder y col., 2007).

La exposición al calor del escroto es otro factor que puede afectar a la espermiogénesis favoreciendo la aparición de roturas en el ADN. Determinados trabajos, como conductores de larga distancia, trabajadores de oficina, soldadores, trabajadores de fundición o panadería (Song y Seo, 2006) así como los baños de sauna (Shefi y col., 2007), o incluso el uso de computadoras portátiles (Sheynkin y col., 2005), pueden producir hipertermia escrotal. Esta hipertermia escrotal podría ser similar a la observada en el varicocele, donde la temperatura del escroto se eleva produciendo alteraciones en la espermiogénesis (Goldstein y Eid, 1989).

1.4. Infertilidad e infertilidad masculina/ Efecto de la fragmentación del ADN en reproducción humana

La fertilidad se define como la capacidad que tienen los seres vivos de reproducirse. Basado en este concepto, se asume que la infertilidad es la pérdida de esta capacidad. De acuerdo con la Organización Mundial de la salud (OMS), la infertilidad es la condición patológica por la que una pareja es incapaz de concebir de forma espontánea durante el transcurso de un año manteniendo relaciones sexuales de forma regular (Rowe y col., 2000). Aún así, hay que tener en cuenta que entre un 20% y un 30% de las parejas logran un embarazo después de este tiempo (*The practice committee of The American Society for Reproductive Medicine*, 2006). Esto nos lleva al concepto de subfertilidad, que se refiere a la disminución de la capacidad fértil. El término infertilidad se asocia también a aquellas parejas que abortan repetidamente mientras que esterilidad se refiere a la incapacidad de lograr un embarazo. Por último, es importante remarcar que la infertilidad es una enfermedad que está en aumento especialmente en países desarrollados y se estima que

afecta al 15% de las parejas en edad reproductora, probablemente debido al retraso en la maternidad y a factores externos debidos, entre otras causas, a la contaminación o exposición a determinados productos industriales.

Recientes estudios estiman que el factor masculino, es decir, la presencia de cualquier causa relacionada con la infertilidad en el varón está presente aproximadamente el 20% de los casos. De igual forma, es la mujer la que presenta alguna alteración en otro 38% mientras que en un 27% de los casos se da la coincidencia en que ambos presentan algún problema. Así pues, el factor masculino está presente entre el 27-47% de los casos (Hull y col., 1985). Por último, en un 15% de los casos, no se encuentra ninguna causa aparente que justifique la incapacidad de reproducirse, de manera que son clasificados como infertilidad de origen desconocido o idiopática.

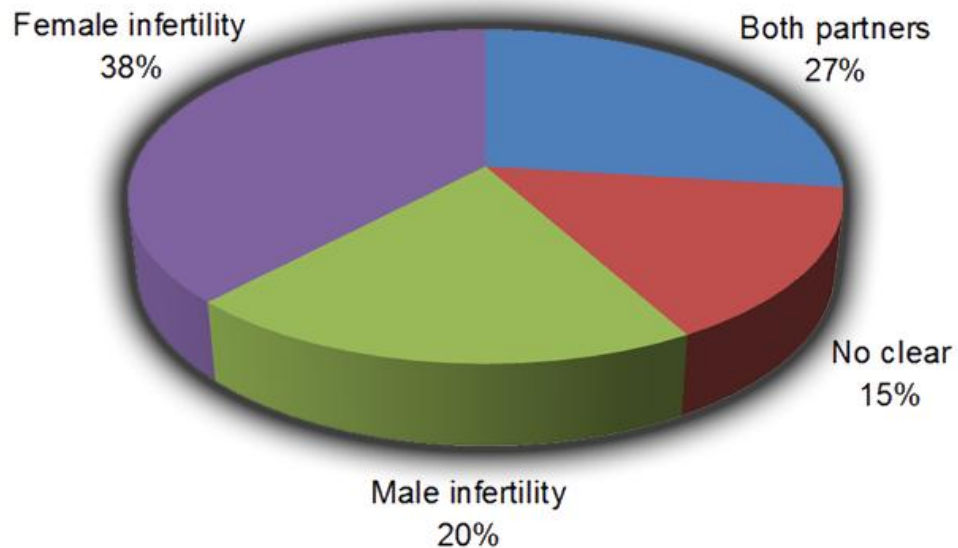


Figura 9. Gráfico en la que se muestra la incidencia de la pareja infértil en el desarrollo de la infertilidad.

Otros estudios estiman en un 7% el porcentaje de hombres afectados de infertilidad. Este dato supone una prevalencia mucho mayor que otras enfermedades habituales como por ejemplo la *diabetes mellitus* tipo I y II considerada por la OMS como una enfermedad común y para la que se estimó una prevalencia del 2,8% en el año 2000, con un aumento previsto de hasta el 4,4 en el 2030.

Desde hace muchos años, el estudio de la infertilidad masculina requiere el análisis del semen o seminograma. Con esta prueba, el especialista puede realizar una primera estimación de la calidad espermática del paciente según los estándares de normalidad que fija la OMS (WHO, 2010). Esta prueba que básicamente consiste en realizar un recuento del número de espermatozoides y evaluar la calidad de su movilidad y su morfología, aporta un valor que es necesario pero a su vez limitado dado que existen individuos fértiles con el seminograma alterado y viceversa. Esto, a veces, comporta que el especialista no pueda concluir cuál puede ser la causa del problema. Al no existir causa aparente de infertilidad se hace imposible llegar a un diagnóstico, y estos pacientes se clasifican como idiopáticos.

Tal y como se ha comentado, el daño del ADN nuclear y mitocondrial puede ser debido a diferentes agentes y circunstancias. En la mayoría de situaciones, la influencia directa o indirecta del estrés oxidativo se encuentra implicada en la aparición del daño. Además de este daño directo al ADN causado por ERO, los daños indirectos se pueden establecer por la estabilidad de carbonilo que contienen productos derivados de la peroxidación de los lípidos, como el malondialdehído (MDA), el 4-hidroxi-2-alkenals o el 4-hidroxi-nonenal (HNE). Estos subproductos se producen si las ERO causan daño en la membrana plasmática del espermatozoide, que es extraordinariamente rica en poliácidos

grasos insaturados (Aitken y col., 1989). El daño al ADN en sí es provocado por la alta mutagenicidad o genotoxicidad de estos productos (Luczaj y Skrzydlewska, 2003).

Sobre la gran importancia que la literatura general atribuye a la influencia del daño del ADN espermático en la fertilización y el embarazo (Bellver y col., 2010; Simon y col., 2011), se puede afirmar con seguridad que el daño del ADN espermático tiene un impacto significativo no sólo en tasas de fertilización y el embarazo, sino también en la salud de la descendencia. En este contexto, el daño del ADN espermático ha sido relacionado con cáncer, autismo y epilepsia (Ji y col., 1997; Aitken y Krausz, 2001; Sipos y col., 2004; Vestergaard y col., 2005; Reichenberg y col., 2006). Por lo tanto, desde un punto de vista clínico, es esencial que la fragmentación del ADN espermático se tenga en cuenta y se evalúe antes de proceder a realizar un tratamiento de reproducción asistida.

1.5. Métodos de determinación de la fragmentación del ADN espermático

En la actualidad, existen una variedad de métodos de evaluación del daño en el ADN. A continuación se introducen algunos de los fundamentos en los que se basan los métodos de estudio de la fragmentación del ADN espermático utilizados en este trabajo.

1.5.1. TUNEL (*Terminal transferase dUTP Nick-End Labeling*)

Se trata de una metodología basada en la adición enzimática de nucleótidos marcados fluorescentemente en los puntos de rotura del ADN, independientemente de que éstos sean de cadena simple (*single strain* DNA; ssDNA) o de doble cadena (*double strain* DNA; dsDNA). La enzima que cataliza esta reacción es una transferasa terminal (TdT) que

tiene la capacidad de transferir el nucleótido conjugado con el fluorocromo en los extremos 3' OH del ADN generados como consecuencia de roturas en el ADN. Estas roturas pueden tener su origen tanto en la acción de otras enzimas, como nucleasas o topoisomerasas, como en la acción de radicales libres, como el ion superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH), alcoxilo (RO.), peroxilo (ROO.) y el óxido de nitrógeno (NO.). La intensidad de fluorescencia depende de la mayor o menor presencia de roturas en el ADN de cada célula afectada, en este caso de espermatozoides humanos.

La señal fluorescente se observa tanto en espermatozoides fijados sobre un portaobjetos visto a microscopio de fluorescencia como en espermatozoides en suspensión sometiendo la muestra a un citómetro de flujo. El análisis de fluorescencia permite establecer el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado presentes en la muestra respecto del total de espermatozoides analizados.

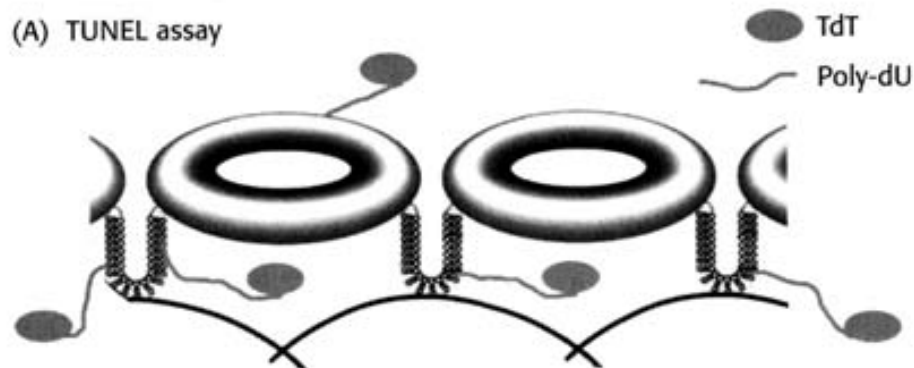


Figura 10. Representación esquemática en la que se representa los lugares de marcaje mediante el método TUNEL. Las regiones MAR (ADN unido a histonas) y aquellas regiones de ADN toroidal mal empaquetado son regiones susceptibles de marcaje.

1.5.2. SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*)

Esta metodología determina la susceptibilidad de la cromatina espermática a desnaturalizarse *in situ* tras un tratamiento a pH ácido. En principio, se asume que cuantas más alteraciones en la estructura de la cromatina existan, tantos más lugares de desnaturalización se producirán. Así pues, el ADN de un espermatozoide que presente una buena integridad de la cromatina no se desnaturaliza, o se desnaturaliza menos, que otro que presente alteraciones en su cromatina.

Durante la maduración del espermatozoide, las histonas nucleares son reemplazadas por protaminas, las cuales son ricas en residuos arginina y cisteína. A continuación, en el epidídimo, la cromatina se estabiliza como consecuencia de la formación de puentes disulfuro entre e intra protaminas produciendo un núcleo altamente compacto en el que el ADN que contiene es, en condiciones normales, mucho más resistente a desnaturalizarse.

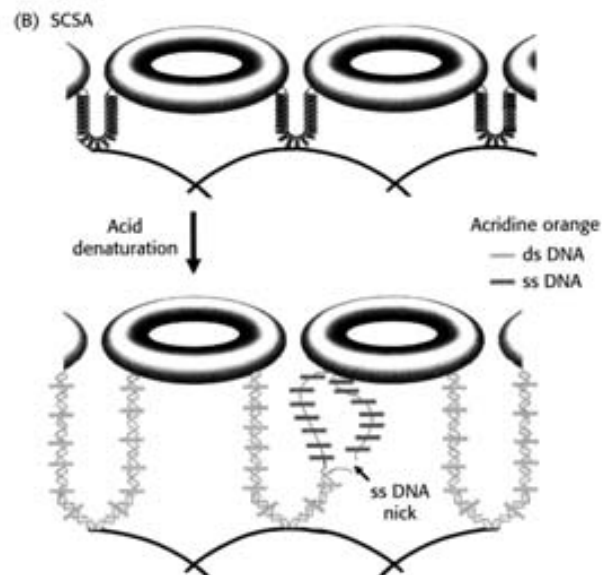


Figura 11. Representación esquemática en la que se representa los lugares de marcaje mediante el método SCSA. Las regiones con roturas en el ADN son susceptibles de desnaturalizarse en medio ácido emitiendo en una longitud de onda característica mediante tinción con Naranja de Acridina.

El SCSA mide la susceptibilidad a desnaturalizarse del ADN espermático cuando se somete a un tratamiento ácido seguido de una tinción con Naranja de Acridina, un colorante metacromático que es capaz de emitir fluorescencia verde en una longitud de onda comprendida entre los 515-530 nm y emitir fluorescencia roja en una longitud del onda mayor o igual a los 630 nm. La emisión en una u otra longitud de onda dependerá de si el ADN se encuentra en forma bicatenaria o monocatenaria. Esto se debe a que en el ADN bicatenario el colorante se intercala en forma de monómero emitiendo en verde mientras que cuando el ADN se encuentra en forma monocadena se intercala formando agregados que emiten en rojo. EL SCSA mide el ratio de cadena simple y cadena doble en cada espermatozoide. Una mayor proporción de cadena simple que de doble indica un mayor grado de desnaturalización del ADN y por lo tanto, una estructura de la cromatina más frágil.

Este método requiere de un citómetro de flujo para su análisis y el autor recomienda analizar exactamente 5.000 espermatozoides. La intensidad de la relación de fluorescencia roja/fluorescencia verde es recogida por los detectores del citómetro que a través de un software específico determina la posición en el gráfico.

1.5.3. SCDt (*Sperm Chromatin Dispersion test*)

El test de la dispersión de la cromatina espermática (*Sperm Chromatin Dispersion test*, SCD) fue descrito en el año 2005 por Fernández y colaboradores (Fernández y col., 2005). Se basa en el principio de que un espermatozoide con el ADN fragmentado no es capaz de producir un halo característico de cromatina descondensada. Aprovechando esta

característica, se provoca una descondensación diferencial de la cromatina en aquellos espermatozoides que tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen. Este efecto se consigue mediante un tratamiento ácido seguido de una desproteinización, de forma que los espermatozoides con fragmentación no liberan bucles de ADN y no generan un halo de dispersión de la cromatina. Por el contrario los que no están fragmentados dan lugar a grandes halos de dispersión que corresponden a bucles de ADN. El análisis de la muestra posterior al tratamiento se realiza mediante un microscopio de campo claro o fluorescencia en función del tipo de tinción que se utilice.

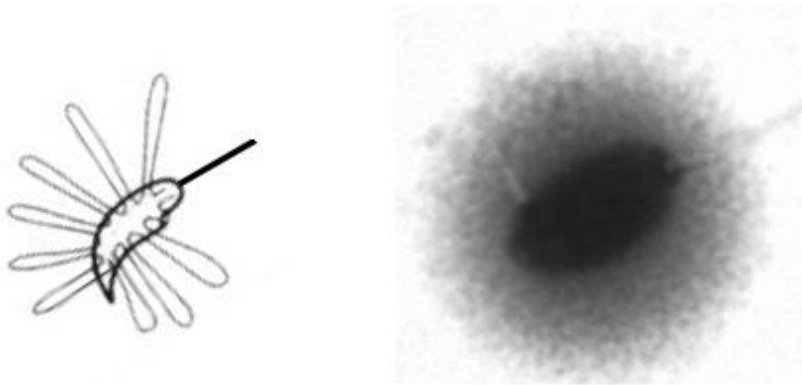


Figura 12. Representación esquemática de cromatina descondensada (izquierda). Según el modelo, cada halo (derecha) está formado por la descondensación de las toroides los cuales empaquetan hasta 50kb de ADN. Los espermatozoides con el ADN fragmentado no presentan estos halos.

1.6. Infertilidad asociada a fragmentación del DNA espermático: tipología del paciente

El diagnóstico de infertilidad no va siempre asociado al del seminograma. A menudo se da la situación de que un mismo diagnóstico, como por ejemplo la astenoteratozoospermia, puede estar presente en pacientes con una enfermedad de base

como el varicocele o en pacientes portadores de una reorganización cromosómica, entre otros. También se da la situación contraria, en la que no hay una causa aparente que justifique unos parámetros seminales alterados. Estas diferencias pueden llegar a ser muy significativas a la hora de determinar el potencial fértil del individuo, ya que estas patologías tienen un impacto sobre la calidad espermática a través de determinados mecanismos que pueden provocar, por ejemplo, una situación de estrés oxidativo. Por esta razón, los pacientes incluidos en este trabajo se han clasificado de acuerdo a estas características. Distinguimos, pues, el varicocele ya sea clínico o subclínico, intervenidos quirúrgicamente o no. Otro grupo de pacientes se ha establecido en base a si presentaban algún tipo de reorganización cromosómica y finalmente, se ha establecido un grupo de pacientes con diagnóstico de astenoteratozoospermia y otro grupo de donantes de fertilidad probada como grupo control.

A continuación se describen las tipologías de pacientes que han sido objeto de estudio en esta tesis.

1.6.1. Varicocele

El varicocele se define como una dilatación venosa del plexo pampiniforme. Esta alteración se ha asociado con la infertilidad masculina tras observarse que un porcentaje elevado de hombres infértiles con seminograma alterado presentaban también un varicocele. La incidencia del varicocele se ha calculado que es de entre el 4,4%-22,6% en la población general, de un 21%-41% en los hombres con infertilidad primaria y hasta en un 75%-81% en hombres con infertilidad secundaria. Aunque muchos hombres con varicocele son capaces de tener hijos, los datos obtenidos en varios estudios demuestran

que el varicocele es un factor que disminuye la fertilidad y que el tratamiento quirúrgico puede ofrecer una mejoría de la capacidad fértil del paciente. Sin embargo, la heterogeneidad de parámetros relacionados con el varicocele, desde el grado de afectación, la edad del paciente y su pareja hacen complicado establecer la magnitud real de la afectación del varicocele sobre la fertilidad hasta el punto en que actualmente genera controversia. Uno de los puntos más discutidos es sobre el tratamiento que deben recibir estos pacientes. En la actualidad, la *American Urological Association and the American Society for Reproductive Medicine (ASMR)* (Gangel, 2002) recomienda ofrecer tratamiento quirúrgico a aquellos casos de varicocele palpable que además presentan uno o dos parámetros seminales alterados. Sin embargo, las evidencias recogidas en una revisión Cochrane del 2009 no muestran que el tratamiento quirúrgico mejore la concepción en estos pacientes.

1.6.1.1. Diagnóstico del varicocele

Existen muchas formas de diagnosticar un varicocele pero los métodos mas corrientes son la exploración física y la ecografía testicular. En la exploración física se establece una gradación del varicocele (Sistema de Dubin): grado 3 cuando el varicocele es visible manteniéndose el paciente en posición de pie, grado 2 si el varicocele es palpable sin realizar la maniobra de Valsalva y grado 1 cuando el varicocele no es visible y es palpable con la maniobra de Valsalva. A los varicoceles diagnosticados de esta forma se les denomina varicocele clínico. Cuando la presencia de varicocele se determina mediante métodos de ultrasonografía (Eco-Dopler) el varicocele se le denomina subclínico y requiere

al menos la presencia de venas dilatadas con un diámetro mayor de 3 mm con flujo reverso después de la maniobra de Valsalva (Lee y col., 2008; Hirst y col.1980).

1.6.1.2. Fisiopatología del varicocele.

La etiología y fisiopatología del varicocele es compleja y multifactorial y además empeora con la edad. Es extremadamente raro en niños prepuberales mientras que en la adolescencia tiene una incidencia del 15%. Dado que el varicocele está presente tanto en hombres fértiles como infértiles, se piensa que factores genéticos y algunas toxinas pueden actuar como cofactores potenciales en el desarrollo del varicocele. La mayoría de los varicoceles afectan al testículo izquierdo. Esto se debe posiblemente a la configuración anatómica de la vena espermática en su inserción con la vena renal, que produce una presión hidrostática más elevada y ocasiona un reflujo anómalo de la circulación venosa. La presencia de un varicocele contribuye a un aumento de la temperatura escrotal, así como estrés oxidativo, cambios en hormonas sexuales, reflujo de hormonas adrenales y autoinmunidad, además de una reducida capacidad antioxidante y un aumento de ERO (Agarwal y col., 2006). El incremento de la presión venosa reduce el flujo sanguíneo testicular produciendo hipoxia testicular, y se acumulan metabolitos tóxicos que dañan el tejido testicular. También se han descrito en pacientes con varicocele un desequilibrio a nivel del eje hipotalámico pituitario gonadal y niveles reducidos de linfocitos T en sangre periférica que mejoran después de la operación (Hurtado de Catalfo, 2007).

1.6.1.3. Tratamiento del Varicocele

Existe toda una variedad de tratamientos quirúrgicos cuya elección depende del grado de severidad del varicocele. Las más utilizadas son la embolización o escleroterapia, la cirugía abierta (inguinal, subinguinal, retroperitoneal), la laparoscopia y la microcirugía (inguinal o subinguinal).

Abundantes estudios apuntan a que el tratamiento quirúrgico del varicocele mejora la capacidad reproductiva del paciente (Cayan y col., 2008). Sin embargo esta opinión no es compartida por todos los especialistas (Will, 2011). En el caso del varicocele subclínico, algunos investigadores cuestionan el impacto que el tratamiento puede tener sobre estos pacientes (Grasso y col., 2000) y en la actualidad no existen evidencias concluyentes en favor de la reparación del varicocele subclínico.

1.6.2. Portadores de reorganizaciones cromosómicas.

Se estima que entre un 0,4-0,8% de la población general, presenta algún tipo de alteración cromosómica, ya sea numérica o estructural (De Braekeleer y Dao, 1991; Nielsen y Wohler, 1991). Se estima que en individuos que consultan por infertilidad, entre el 2-8% son portadores de alteraciones cromosómicas (Ferlin y col., 2007). Este porcentaje se incrementa hasta el 13% en individuos azoospermicos (Mau-Holzmann 2005) y un 4.6% de los pacientes oligozoospermicos (Shi and Martin 2001).

Las alteraciones numéricas engloban aquellos casos en los que se presenta una variación en el número de cromosomas (con la consiguiente pérdida o ganancia de ADN) mientras que las estructurales se refieren a variaciones en la distribución del ADN en

alguno o varios de sus cromosomas de modo que no hay ganancia ni pérdida del ADN, por lo que la mayoría de estos individuos no presentan efectos fenotípicos. En la especie humana las variantes cromosómicas estructurales más frecuentes son las translocaciones robertsonianas (t rob.), las translocaciones recíprocas (t rec.) y las inversiones (inv).

A continuación, se exponen algunas características de las reorganizaciones de tipo translocaciones, e inversiones por ser las incluidas en este estudio:

1.6.2.1. Reorganizaciones cromosómicas estructurales

Engloban las Robertsonianas (t rob.) y las recíprocas (t rec.) e inversiones (inv) entre otras. Las primeras llevan el nombre de su descubridor, el Dr. W.R.B. Robertson quien las describió por primera vez en 1916. Consisten en la unión de dos cromosomas acrocéntricos que pasan a formar un único cromosoma llamado derivativo. Están presentes en 1,23/1000 neonatos. Entre todas las reorganizaciones posibles entre acrocéntricos, la más frecuente es la der(13;14)(q10;q10) la cual está presente en cuatro de cada cinco individuos portadores de translocación Robertsoniana.

Las Translocaciones recíprocas (t rec) consisten en el intercambio de fragmentos cromosómicos entre no homólogos a partir de una rotura en alguno de sus brazos. Durante la reparación se produce un intercambio mutuo de los dos fragmentos terminales generados. Estos cromosomas también reciben el nombre de derivativos y se identifican por el centrómero que presentan. Se estima que entre 1/700 neonatos es portador de alguna translocación recíproca equilibrada.

Las inversiones (inv.) son reorganizaciones intracromosómicas que consisten en un cambio de sentido de una región del cromosoma que puede incluir el centrómero

(inversiones pericéntricas) o no (inversiones paracéntricas). Se estima que entre el 1-2% de la población general son portadores de alguna inversión.

1.6.2.2. Reorganizaciones cromosómicas y fertilidad

El riesgo de afectación de las reorganizaciones cromosómicas sobre la capacidad fértil del individuo se establece según el efecto que pueda ejercer en la adecuada progresión de la meiosis. Dado que durante la profase I del ciclo meiótico es necesario un reconocimiento entre las regiones homólogas de los cromosomas, la presencia de alteraciones cromosómicas impide o dificulta en mayor o menor grado el reconocimiento de esta homología y la posterior segregación al final de la Anafase I. Esto es debido a que los cromosomas adoptan geometrías de apareamiento complejas que favorecen la aparición de regiones asinápticas (Oliver-Bonet y col., 2005). Además, al ser la meiosis un fenómeno altamente regulado, las irregularidades producidas son detectadas por diversos puntos de control los cuales pueden activar mecanismos o iniciar procesos que den lugar a situaciones que comprometan la progresión y la viabilidad celular.

1.6.3. Astenoteratozoospermia (ATZ)

Se trata de aquellos individuos en los que el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y el porcentaje de formas normales está por debajo de los niveles de normalidad según estipula la Organización Mundial de la Salud. Los parámetros de normalidad utilizados en este estudio se corresponden con los recomendados por la OMS del año 1999. En la actualidad, estos valores se han cambiado (De Jonge, 2012).

Ante la necesidad de profundizar en las causas y mecanismos que intervienen en la etiología de la infertilidad, en esta tesis doctoral hemos analizado el valor del estudio de la fragmentación del ADN espermático como prueba complementaria a la hora de abordar la difícil cuestión de la fertilidad. Lo hemos hecho siguiendo una estrategia multimetodológica aplicada en muestras de diferentes grupos de pacientes clasificados según sus características fisiopatológicas y hemos determinado las capacidades, ventajas e inconvenientes de cada uno de los tres métodos utilizados.

2. OBJETIVOS

El primer objetivo planteado propone la puesta a punto de los distintos métodos de análisis para la determinación de la fragmentación del ADN espermático en diferentes tipos de pacientes infértiles mediante el uso de tres metodologías distintas (SCSA, SCD y TUNEL) y la correlación de los resultados obtenidos con estas tres técnicas. Los artículos 2, 3 y 6 presentan los resultados obtenidos para este objetivo.

El segundo objetivo propone la determinación del valor diagnóstico de subpoblaciones de espermatozoides determinadas mediante las técnicas de SCSA y SCD en individuos infértiles. La técnica del SCSA permite identificar el porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura (HDS), mientras que la técnica del SCD permite identificar una subpoblación que presenta un alto grado de fragmentación del ADN (DDS). En el artículo 4 se exponen los resultados obtenidos para este objetivo.

Para la consecución del tercer objetivo, se caracterizó la evolución de la fragmentación del ADN espermático (dinámica de fragmentación) en individuos con varicocele y portadores de reorganizaciones cromosómicas. En los artículos 1 y 3 se exponen los resultados obtenidos para este objetivo.

El cuarto objetivo pretende la caracterización del estado de protaminación en los diferentes tipos de pacientes estudiados, así como su relación con la fragmentación y la dinámica de fragmentación del ADN. Los resultados obtenidos para este objetivo se recogen en el artículo 1.

Finalmente, la consecución del objetivo nº 5 (efecto del tratamiento con antioxidantes orales sobre la fragmentación del ADN y la dinámica de fragmentación en individuos infértiles) se expone en el artículo 5.

Objetivo 1

Puesta a punto de los métodos y determinación del grado de fragmentación del ADN en: **a)** individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas; **b)** un individuo infértil portador de un polimorfismo de heterocromatina pericentromérica del cromosoma 9 (9qh+++) y **c)** en pacientes con varicocele clínico y subclínico antes y después del tratamiento quirúrgico d) valoración y correlación de los métodos utilizados: TUNEL, SCSA y SCD.

Objetivo 2

Caracterizar subpoblaciones espermáticas específicas detectables mediante los métodos SCSA y SCD en los diferentes grupos de pacientes analizados y valorar su aplicabilidad diagnóstica.

Objetivo 3

Caracterizar la dinámica de la fragmentación del ADN en los grupos de pacientes portadores de reorganizaciones cromosómicas y de varicocele.

Objetivo 4

Determinar la relación de protamina P1 y P2 en los diferentes grupos de pacientes así como determinar posibles relaciones con la fragmentación y la dinámica de fragmentación del ADN.

Objetivo 5

Determinar el efecto que ejerce en la fragmentación del ADN, la dinámica de la fragmentación y el seminograma el tratamiento con antioxidantes orales en pacientes infértiles con astenoteratozoospermia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Procedencia, obtención y criopreservación de las muestras.

3.1.1. Procedencia

Con el propósito de disponer de las muestras de semen necesarias para la consecución de los objetivos planteados, se estableció una colaboración con el departamento de Urología del hospital universitario Parc Taulí de Sabadell y del laboratorio de inmunología del UDIAT (Parc Taulí).

Todos los procedimientos aplicados fueron aprobados previamente por el comité de ética de la Corporación Sanitaria Parc Taulí de Sabadell.

3.1.2. Grupos de pacientes y controles

En el conjunto de artículos que integran este estudio, se han incluido un total de 111 muestras de pacientes con problemas de infertilidad. Del total de los pacientes, 79 presentaban astenoteratozoospermia (ATZ) y varicocele clínico (VC) o subclínico (VSc), otros 20 presentaban astenoteratozoospermia sin varicocele y 12 presentaron algún tipo de alteración cromosómica. Dentro de este último grupo, nueve pacientes eran portadores equilibrados de una translocación recíproca, dos eran portadores de una inversión y un paciente presentaba un polimorfismo de heterocromatina en la región pericentromérica del cromosoma 9 que triplicaba el tamaño habitual (9qh+++).

Como grupo control se incluyeron 11 donantes de fertilidad probada de un programa de donación de semen. También se utilizaron otras muestras de pacientes infértiles, generalmente con diagnóstico de ATZ, para poner a punto los protocolos.

El grupo de pacientes incluidos en el estudio con varicocele clínico o subclínico fueron diagnosticados tras acudir a consulta urológica por infertilidad. El varicocele clínico se debe a una dilatación de la vena espermática visible en el escroto mediante un examen físico. El varicocele se clasifica en 3 grados en función de su intensidad. Para esta clasificación es necesaria la exploración física. En el grado I, las venas son pequeñas y se palpan en situaciones de esfuerzo (maniobra de Valsalva); en el grado II las venas se palpan fácilmente sin necesidad de maniobras de esfuerzo; en el grado III (grave) se aprecia una masa escrotal visible sin necesidad de palpación. Por el contrario, se diagnostica como varicocele subclínico a aquellos pacientes que no presentan signos visibles ni aparentes de dilatación de la vena espermática en el examen físico pero que sin embargo, mediante ecografía, se les detecta una dilatación venosa o un retorno venoso anómalo compatible con varicocele.

Los individuos con reorganizaciones cromosómicas incluidos en este estudio presentaban algún tipo de reorganización cromosómica de tipo estructural identificada mediante cariotipo por bandas G tras acudir a consulta por infertilidad o por historial de abortos de repetición.

Los individuos infértiles con ATZ fueron incluidos al presentar al menos dos seminogramas con valores anormales en la motilidad espermática y morfología, según las directrices de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999).

3.1.3. Obtención de muestras

Las muestras de semen de pacientes con varicocele clínico o subclínico, pacientes con astenoteratozoospermia y donantes fértiles fueron obtenidas tras un periodo de

abstinencia de entre tres y siete días en frascos estériles de polietileno, y entregadas en el laboratorio de inmunología (UDIAT) del Parc Taulí de Sabadell. En el caso de los portadores de reorganizaciones cromosómicas, las muestras analizadas proceden de distintos centros de reproducción asistida. Todas las muestras estudiadas se han recogido y criopreservado siguiendo un protocolo adaptado de otros autores (Chernos and Martin, 1989) que se describe a continuación.

3.1.4. Criopreservación

3.1.4.1. Preparación del medio de criopreservación para muestras de semen

El medio de congelación contiene por cada 100 ml:

- 30 ml de yema de huevo
- 1,98 gr de glucosa
- 1,72 gr de citrato sódico
- 56 ml de agua miliQ
- 14 ml de glicerol.

El glicerol evita que las membranas plasmáticas de las células se rompan durante la congelación impidiendo la formación de cristales de agua.

Se prepara en un vaso de plástico estéril. Todos los componentes, excepto la yema de huevo, se filtran con un filtro Millex de 0,22 μm (Millipore Corp. Carrigtwohill, Ireland). Se homogeniza mediante agitación y se pone en un baño a 57° durante 30 minutos para inactivar las proteínas. Después se deja enfriar a temperatura ambiente. Añadir 2 gr de

Glicina y homogenizar. Por último ajustar la mezcla a un valor de pH comprendido entre 7,2 y 7,4 y guardar a -20 °C.

Es recomendable no utilizar este medio de congelación más allá de tres meses tras su preparación. Para facilitar su mantenimiento y manipulación posterior, el medio se reparte en tubos de centrifuga de 5 ml.

3.1.4.2. Criopreservación en TYB

Se trabaja en condiciones estériles bajo campana de seguridad biológica. La muestra de semen se deja licuar durante unos 30 minutos a 37°C. Una vez que se ha licuado se mide el volumen con una jeringa. La muestra se trasfiere a un contenedor de plástico estéril y se va agitando suavemente con un vórtex al mismo tiempo que se añade gota a gota un volumen equivalente (1:1) de medio de criopreservación. A continuación, la mezcla resultante se reparte en criotubos de 1 ml y se congelan a -80°C durante 5-6 horas con alcohol isopropílico. Por último se almacenan en un tanque a -196°C en nitrógeno líquido.

3.1.4.3. Descongelación de la muestra, lavado y ajuste de la concentración espermática.

Justo antes de realizar el análisis, las muestras se descongelan por inmersión en un baño de agua a 37 °C de temperatura durante 30 segundos. Inmediatamente, se recoge todo el contenido con una pipeta Pasteur de plástico y se deposita en un tubo de centrifuga de 10 mL. Se diluye en una proporción 3:1 de PBS 1x (que no contiene Ca^{2+} ni Mg^{2+}) y a continuación se centrifuga durante 4 minutos a 300 g. Se decanta el sobrenadante y se

repite la operación dos veces más. Finalmente, el pellet se resuspende en PBS de modo que la concentración final esté comprendida entre los 5-10 millones de espermatozoides/mL.

3.2 Técnicas de análisis de la fragmentación del ADN espermático

El análisis de la fragmentación del ADN espermático se ha determinado mediante las metodologías TUNEL, SCSA y SCD.

3.2.1 TUNEL (Terminal transferase dUTP Nick-End Labeling)

Este método se basa en la incorporación de nucleótidos conjugados con un fluorocromo mediante una transferasa terminal (TdT) en los extremos 3'-OH que se generan como consecuencia de una rotura en el ADN. Esta incorporación se produce indistintamente de que las roturas sean de cadena simple (single strand, ssDNA) o doble (doble strand, dsDNA). Las roturas del ADN pueden deberse tanto a la acción de otras enzimas como nucleasas o topoisomerasas o también por radicales libres, como el ion superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH), alcoxilo (RO), peroxilo (ROO) y el óxido de nitrógeno (NO). Dado que la intensidad de fluorescencia refleja la presencia de roturas en el ADN de cada célula afectada, en este caso de espermatozoides humanos, es posible detectar dicha fluorescencia mediante un microscopio de fluorescencia o un citómetro de flujo y así establecer qué porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado hay en una muestra respecto del total.

En este estudio hemos utilizado el kit que comercializa ROCHE (Ref.11684795910, Roche Diagnostic GmbH; Penzberg, Germany), cuyo protocolo se describe a continuación:

- Preparación de las muestras

Las muestras criopreservadas, son en primer lugar descongeladas introduciendo el vial en un baño a 37 °C durante 30 segundos. A continuación, se trasvasa el contenido en un tubo de 5 ml con la ayuda de una pipeta Pasteur y se realizan tres lavados en PBS mediante centrifugación a 600g durante cinco minutos descartando en cada lavado el sobrenadante. Es importante no prolongar demasiado esta etapa ya que la muestra aún no ha sido fijada y existe el riesgo de que se produzcan nuevas roturas en el ADN. Se debe trabajar en un recipiente con hielo (2-8°C), para evitar al máximo la generación de nuevas roturas. Finalmente, se ajusta la concentración espermática hasta 5 millones por mililitro en PBS. En el caso de que las muestras procedan de eyaculados frescos, los lavados se realizarán para retirar el plasma seminal y ajustar la concentración espermática.

- Fijación

Se realizan 2 lavados adicionales con 200 µL de PBS/1% BSA utilizando tubos eppendorf pequeños (500 µl). El BSA (Bovine Serum Albumin) reduce la cantidad de muestra que se pierde en cada lavado. Después, se resuspende el pellet en 100 µL de PBS/1%BSA, se añaden 100 µL de la solución de fijación que contiene paraformaldehído al 4% y se incuba la suspensión durante 1h entre 15-25°C. Tras la incubación se centrifuga a 600g durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante. Finalmente, se realiza 1 lavado con 200 µL de PBS/1% BSA para eliminar cualquier resto de solución de fijación.

- Permeabilización

Se resuspenden los pellets en 100 μ L de solución de permeabilización y se incuban durante 2 minutos en hielo (2-8°C). A continuación se centrifuga a 600g, durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante. Para eliminar cualquier resto de solución de permeabilización se realizan 2 lavados con 200 μ L PBS/1% BSA. Finalmente, tras descartar el sobrenadante, se procede a la fase de marcaje.

- Preparación de la mezcla de reacción TUNEL

Dada la toxicidad de la solución de marcaje es obligatorio trabajar siempre en campana de extracción de gases y seguir todas las medidas de seguridad del fabricante tanto durante el análisis como en la gestión de todos los residuos generados.

Por cada muestra y control positivo se utilizan 5 μ l de la solución enzimática (vial 1) y 45 μ l de la Solución de marcaje (vial 2) para formar la mezcla de reacción TUNEL. Es importante realizar la mezcla de reacción TUNEL inmediatamente antes de usarse y mantenerla en hielo y protegida de la luz.

- Preparación controles positivos y negativos

La muestra que será utilizada como control negativo recibirá el mismo tratamiento que la muestra problema con excepción de que durante la fase de marcaje se omitirá la enzima que produce la reacción. Para la preparación de un control positivo se utilizarán espermatozoides previamente fijados y permeabilizados sometidos a incubación durante 10 minutos a una temperatura entre 15 y 25°C en un volumen de 50 μ l que contiene una

nucleasa micrococcal o DNAsa I, grado I equivalente a 2 UI/eppendorf para inducir la rotura de cadena del ADN. Tras este tratamiento, la muestra se centrifuga a 600g, 5 minutos y se descarta el sobrenadante (contiene la DNAsa I). Por último se realiza un lavado en 200 μ L de PBS/1% BSA.

- Marcaje

A la muestra problema y al control positivo se añaden 50 μ l de mezcla de reacción de marcaje. A continuación se incuba durante 1 hora a 37°C en la oscuridad agitando cada 15 minutos. Es importante asegurarse de que la temperatura de reacción es exactamente 37°C dado que un aumento de la temperatura puede producir alteraciones en los resultados. Después, se centrifuga a 600g durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante. Para eliminar cualquier resto de solución de marcaje se realizan 2 lavados más en 200 μ L de PBS/1% BSA. Finalmente, se resuspende el pellet en 100 μ L para realizar una extensión y visualización al microscopio de fluorescencia o en 500 μ l de PBS para un posterior análisis citométrico.

- Análisis mediante microscopía de fluorescencia

La muestra se diluye en un volumen de 100 μ l y se realiza una extensión sobre un portaobjetos que se deja secar en la campana de extracción de gases. Se añade un contraste intercalante del ADN, como por ejemplo DAPI, mezclado con un agente protector de la fluorescencia (Vectashield, Vector Labs, Burlingame, CA, USA). De este modo, utilizando los filtros verde y azul correspondientes, las células TUNEL positivas se verán en verde (si

el fluorocromo es el isotiocianato de fluoresceína-FICT, como es el caso) y en azul las TUNEL negativas.

- Análisis mediante citometría de flujo.

La muestra se diluye en PBS hasta un volumen de 500 μ l y se mantiene en la oscuridad hasta el momento de realizar el análisis. Se utiliza un citómetro de flujo (FACSCalibur; Becton Dickinson, NJ, USA) que tiene instalado para el proceso de datos el software CELLQUEST (Becton Dickinson). En cada muestra se contabilizan 10,000 espermatozoides. Para la detección de fluorescencia (FICT) se utilizó un filtro de 530 nm \pm 30 nm a un flujo de 200-300 espermatozoides por segundo.

Preparación de reactivos

PBS/1% BSA: para preparar 10 ml, se pesan 100 mg BSA (Bio Rad Standard II, Bovine Serum Albumin) y se disuelven en 10 ml de PBS. Para preparar el PBS/0,1% BSA hacer una dilución 1:10 de la anterior.

Solución de fijación: para preparar 1 mL de una solución al 4% de paraformaldehído en PBS, pH 7.4, se pesan 0.04 g de paraformaldehído (Merck 4005.100) y se disuelven en 1 ml de PBS (Bio Merieux, 7 551 1, pH 7,2, 150 mmol/L).

Solución de permeabilización: para preparar 10 mL de una solución al 0,1% de Tritón X-100 en citrato de sodio al 0,1% se disuelven 10 mg citrato de sodio

(Calbiochem, 567446) en 9900 μL de H_2O desionizada. Finalmente se añaden 10 μL Tritón X-100 (Sigma X-100).

DNAsa I, grado I (Sigma DN 25. Deoxiribonucleasa I). La presentación de la DNAsa I es de 100 mg. Preparar la DNAsa I en una solución que contenga 50

100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mg/mL BSA. Para preparar 100 mL de Tris, se disuelven 0,6057g Tris en H_2O (sin llegar a 100 mL ya que se le ha de añadir HCl para ajustar el pH a 7.5). Ajustar el pH a 7.5. Si en 1 mg de DNAsa I hay 660 U, tendremos 40 U en 0,0606 mg de DNAsa I. Se diluye en 1 mL de Tris-HCl 6,06 mg de DNAsa I grado I. De esta forma se tendrán 4000 U de DNAsa I. Hacer alícuotas de 50 μL y congelar a -20°C .

3.2.2 SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)

Esta metodología determina la susceptibilidad de la cromatina espermática a desnaturalizarse *in situ* tras un tratamiento a pH ácido. El método asume que cuantas más alteraciones en la estructura de la cromatina existan, tantos más lugares de desnaturalización se producirán. El ADN de un espermatozoide con una buena integridad de la cromatina se desnaturaliza menos que otro que presenta roturas o defectos en su cromatina. Para visualizar este efecto, se añade un colorante con propiedades metacromáticas. El Naranja de Acridina (Acridine Orange, AO) se intercala en el ADN en forma de monómero o formando agregados. Este estado de agregación produce una emisión a una longitud de onda (rojo, 630 nm) u otra (verde 510-515 nm) en función de cómo se

produce esta desnaturalización: las regiones que emiten en rojo son las susceptibles a desnaturalizarse y en consecuencia presentan algún tipo de alteración (rotura del ADN, mala protaminación) y las regiones que emiten en verde no son susceptibles de desnaturalización porque no tienen ninguna alteración. La discriminación entre ambas emisiones se realiza mediante citometría de flujo. Se contabilizan 5.000 espermatozoides en un flujo de 200-250 células por segundo.

Protocolo

- Preparación de las muestras: descongelar las muestras sumergiéndolas en un baño a 37°C. Lavar con buffer TNE y ajustar la concentración a 1-2 millones de espermatozoides por mL.
- Desnaturalización ácida: añadir 400 µl de solución ácido-detergente a 200 µl de muestra diluida. Agitar y mantener durante 30 segundos.
- Tinción: Añadir 1,2 ml de solución de AO. Agitar y colocar la muestra en el tubo de adquisición del citómetro. Esperar 3 minutos a que se equilibre y adquirir la emisión de fluorescencia verde y roja de 5.000 espermatozoides por cada muestra a analizar.

Soluciones

Solución TNE (10x), pH 7.4. Para preparar 600 mL se pesan 9,48 gramos de Tris-Cl (0,1 M), 52,6 g NaCl (1,5 M) y 2,23 gr de EDTA disódico (10mM). Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 2N. Para preparar TNE1x, hacer una dilución en H₂O y comprobar el pH.

Solución ácido-detergente: Para preparar 500 mL. Tomar 20 mL de una solución 2 N de HCL, 4,39 gr de NaCl y 0,5 mL de Tritón X-100. Por último se ajusta el pH a un valor de 1,2 con una solución 5 N de HCl.

Solución de normalización. 400 μ L de solución ácido-detergente y 1,2 mL de solución de tinción de naranja de acridina.

Solución de tinción Naranja de Acridina. Añadir 600 μ L de la solución stock de Naranja de Acridina por cada 100 mL de solución de tinción.

Solución stock de naranja de acridina, 1 mg/ml. Disolver 10 mg de Naranja de Acridina en 10 mL de agua. Proteger de la luz y conservar a 4°C. La solución es estable durante meses.

Solución de tinción a pH 6.0: 370 mL de 0,1 M de una solución de ácido cítrico (21,01 gr de ácido cítrico en 1 litro de H₂O), añadir 630 ml de una solución 0,2 M de Na₂PO₄, añadir 372 mgr de EDTA disódico (PM: 372,24), añadir 8,77 gr de NaCl. Ajustar el pH a 6 con una solución de NaOH. Guardar a 4°C. Para preparar 1 l, se pesan siete, 1 g de ácido cítrico 0,037 M, 22,42 g de Na₂HPO₄ 0,126 M, 8,766 gr de 0,15 M NaCl y se ajusta el pH un valor de seis.

Solución de trabajo: en el momento de realizar la tinción se tienen que medir 6 μ l por cada mL de buffer de tinción que queramos preparar de naranja de acridina previamente disuelto en agua destilada a una concentración de 1 μ gr/ μ l

Solución stock de AO: se disuelven 500 μ g de OA en 500 μ l de agua destilada.

3.2.3 SCD

El test de la dispersión de la cromatina espermática (Sperm Chromatin Dispersion test, SCD) se basa en el principio de que un espermatozoide con el ADN fragmentado no es capaz de producir un halo característico de cromatina descondensada cuando la muestra se somete a un tratamiento de desnaturalización a pH ácido y una desproteización controlada (Fernández et al., 2005 o 3). Para este estudio, se ha utilizado la versión comercial de este test, Halosperm (Halotech S.L.; Madrid, Spain).

A continuación se describe el protocolo según establece el fabricante:

Protocolo

Preparación de la muestra y ajuste de la concentración

Antes de comenzar a procesar las muestras se debe poner la solución de lisis a temperatura ambiente (22°C). Descongelar las muestras de semen introduciéndolas en un baño a 37°C hasta que queden completamente líquidas y lavar en PBS1x para retirar los restos de medio de criopreservación. Ajustar la concentración espermática a un valor de entre 5-10 millones de espermatozoides por mililitro.

Incubar en un baño a 95-100°C o microondas un tubo eppendorf que contiene agarosa de bajo punto de fusión para licuarla y seguidamente traspasarlo a un baño a 37°C durante 5 minutos. Cuando la agarosa se atempera se añaden 25µL de muestra, se homogeneiza bien con pipeta y de esta mezcla se coge un volumen de mezcla de entre 14-20 µL que se deposita sobre un portaobjetos previamente tratado con agarosa, y se coloca

un cubreobjetos de 18x18 o 22x22 mm, según el volumen depositado. Permitir la gelificación durante 5 minutos, situando el porta en una nevera a 4°C sobre una superficie horizontal metálica. Mientras gelifica, preparar la solución desnaturalizante diluyendo 80 µL de solución AD (agent denaturing) en 10 mL de agua destilada. A continuación, se retira el cubreobjetos con cuidado de no romper el gel y se incuba en la solución desnaturalizante durante 7 minutos. Pasado este tiempo, se realiza una segunda incubación durante 25 minutos en una solución de lisis que contiene agentes reductores y detergentes que descompactarán el núcleo del espermatozoide. Pasado este tiempo se realiza una incubación en agua destilada durante 5 minutos, seguida de tres incubaciones de 2 minutos cada una en etanol al 70%, 90% y 100%. Este tratamiento deshidrata el gel, fija el ADN y hace que los espermatozoides queden en el mismo plano facilitando su mantenimiento (las muestras son estables durante meses a temperatura ambiente) y observación al microscopio.

Observación al microscopio

Las muestra fueron teñidas usando yoduro de propidio 1mgr/mL o DAPI (2 µg/mL) (Roche Diagnostics; Barcelona, Spain) in Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). Se contabilizaron entre 200 y 300 espermatozoides por muestra distinguiendo los que presentaban un halo de dispersión de la cromatina (ADN no fragmentado) de los que no (ADN fragmentado). Dentro de la categoría de espermatozoides con ADN fragmentado (sin halo) se contabilizaron aquellos que presentaban un aspecto más degradado.

3.3. Dinámica de la fragmentación del ADN espermático

Es la tasa de fragmentación del ADN por unidad de tiempo expresada en porcentaje. Las muestras se incuban a temperatura fisiológica de 37°C y se calcula la diferencia del porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado entre un periodo de tiempo ($T_{final} - T_{inicial}$) dividido por el número de horas que comprende este periodo de incubación. El resultado es la tasa de fragmentación o incremento por unidad de tiempo expresada en horas. Las incubaciones realizadas en este estudio han comprendido periodos de tiempo de entre 0h y 24h y se ha determinado la fragmentación del ADN con la metodología SCD anteriormente descrita.

3.4 Determinación de la relación Protamina1/ Protamina2

3.4.1 Extracción de proteínas espermáticas

Extracción Ácida

- Eliminar el fluido seminal o medio de criopreservación centrifugando las muestras a 10.000g durante 5 minutos y a una temperatura de 4 °C. Ajustar la concentración a 15 millones de espermatozoides por mililitro.
- Añadir 1mL de medio Ham F10 1x (Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Paisley, UK). Centrifugar de nuevo a 10,000g durante 5 minutos a 4°C y resuspender el pellet en 300 µl (Ham F10 1x).
- Repetir el paso anterior.

- A continuación, para desestabilizar las membranas del espermatozoide, se lava el sedimento con 200 µl de una solución de permeabilización que contenga Tritón X-100, Tris 1M pH 8 y 1M de MgCl₂. Centrifugar a 10.000g 5 minutos, 4°C. En este paso es aconsejable retirar el sobrenadante con pipeta.
- Resuspender el sedimento con 200 µl PMSF 1mM. Centrifugar (10.000g, 5 minutos 4°C). Este tratamiento produce un choque hiposmótico que lisa las células. El sobrenadante se retira con pipeta.
- Repetir el paso anterior.
- Resuspender el sedimento en 50 µl de una solución que contenga EDTA 20mM, PMSF 1mM y Tris-HCl pH 8 100 mM.
- Añadir 50 µl de una solución que contenga 6 M de hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) y 575 mM DTT. En este paso se eliminan los puentes disulfuro que estabilizan a las protaminas. Es necesario mezclar bien, mediante agitación manual y con pipeta e incluso con un punto de vórtex hasta que se forma una masa de aspecto mucoso y de consistencia viscosa.
- Añadir 100 µl de agua destilada miliQ. Mezclar bien e incubar entre 10-30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- Añadir 500 µl de etanol frio. Incubar de 10 a 30 minutos a una temperatura de
- -20°C. (llegados a este punto la técnica puede pararse el tiempo que se estime oportuno).
- Centrifugar nuevamente a 12.000g durante 5 minutos a 4°C y eliminar el sobrenadante mediante decantación primero, y después, ayudándose de una pipeta con tal de eliminar el máximo volumen posible.

- Añadir 500 µl de una solución 0.5 M de HCl. Homogeneizar con vórtex e incubar 5 minutos a 37 °C. Repetir el vórtex y dejar incubar durante 2 minutos más.
- Centrifugar durante 10 minutos a 14.000g, 4°C. Las proteínas están en el sobrenadante que se ha de poner en un tubo pre-enfriado con un 20% de TCA (125 µl de TCA al 100%). Se mezcla invirtiendo el tubo varias veces.
- Incubar durante 10 minutos a 4°C para permitir que precipiten las proteínas
- Centrifugar nuevamente durante 10 minutos a 14.000g, 4°C. Eliminar el sobrenadante por decantación. Las proteínas quedan en el pellet
- Lavar con 500 µl de una solución que contenga 1% de B-mercaptoetanol en acetona y que se ha de preparar al momento. Centrifugar durante 5 minutos, 14.000g, 4°C.
- Se repite el paso anterior
- Dejar secar las proteínas al aire tomando las medidas necesarias para evitar la contaminación por proteasas. Una vez que la muestra se ha secado, las proteínas son estables y se pueden conservar durante meses y años en el congelador de -80°C.
- Para preparar las proteínas antes de cargarlas en el gel, se resuspenden en 20 µl de tampón de muestra. Se pueden congelar a -20°C. En los geles se cargan entre 5-10µL.

Soluciones

Solución de permeabilización, para preparar un mL se toman 20 µl de una solución 1M de Tris-HCl pH 8, se añaden 4 µl de una solución 0,5M de MgCl₂, 5 µl de Tritón X-100 y, finalmente, se añaden 971 µl de H₂O miliQ.

Para preparar 200 μl de PMSF (1mM) a 10 μl de una solución de PMSG 100 mM se le añaden 990 μl de H_2O miliQ.

Solución EDTA 20mM, PMSF 1mM y Tris-HCl pH 8 100 mM. Para preparar un mL se toman 100 μl de una solución 1M Tris-HCl pH 8, se añaden 40 μl de una solución 0,5 M EDTA, 10 μl de una solución 100nM de PMSF y finalmente se añaden 971 μl de H_2O miliQ.

Solución GuHCl/DTT (575 mM, 6M GuHCL), para preparar 500 μl se pesan 0,04435 gr de DTT y se disuelven en 500 μl de GuHCL.

Solución de B-mercaptoetanol (1%) en acetona, para preparar 10 mL se toman 0,1 ml de B-mercaptoetanol y se mezclan con 9,9 mL de acetona.

Tampón de muestra (5,5 M Urea, 20% B-mercaptoetanol, 5% de ácido acético). Para preparar 1 mL se pesan 0,330 gr de urea, 200 μl de B-mercaptoetanol, 50 μl de ácido acético y se ajusta hasta 1 ml con H_2O miliQ.

3.4.2 Separación de proteínas, preparación de los geles de acrilamida

Para la realización del gel de poliacrilamida, se ha utilizado el sistema Miniprotein System (Bio-Rad, Life Science Group, Hercules, CA, USA) que permite hacer geles cuyo tamaño se adecúa al tipo de muestra que queremos analizar.

Para montar el gel, primero se lavan los vidrios con etanol y a continuación se montan sobre el soporte siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se

comprueba que hemos realizado correctamente el montaje añadiendo un poco de agua. Si no pierde, se vacían y se seca el resto de agua que quede con papel absorbente para que no altere la concentración de acrilamida. Después, se añade entre los dos vidrios la solución de poliacrilamida evitando que se formen burbujas. Colocar el peine y dejar gelificar entre 30 minutos y una hora. Retirar el peine y lavar con agua destilada los pocillos.

Soluciones

Para preparar el gel de acrilamida (urea 5,5 M, 5% de ácido acético, 15,1% acrilamida/bisacrilamida) se añaden los siguientes componentes en el orden indicado: para un volumen de 15 mL (dos geles) se pesan 2,25 gr de urea, se añaden 771 µl de ácido acético y 7,5 ml de una solución al 30% de acrilamida/0,2% bisacrilamida. Finalmente se enrasa el volumen a 15 ml con H₂O.

Para que el gel polimerice hay que añadir una solución que contenga TEMED (0,53%) y APS (5,3%). Pero antes hay que dejar degasificar la solución de acrilamida. Para ello, bastará con dejarla reposar durante 30-40 minutos. Pasado este tiempo se añade 80 µl de TEMED y 800 µl de 10% APS.

3.4.3. Pre-electroforesis

Colocar los geles en las cubetas y llenarlas con tampón Acido acético 0,9 N (123,43 ml acido acético hasta 2,5 l de agua miliQ)

Colocar la polaridad de los electrodos de la cubeta correctamente (conectar al mismo color del electrodo) pero la polaridad de los electrodos de la fuente se ha de poner

invertida (rojo con el negro y el negro con el rojo). Ajustar el voltaje a 150 V durante 75 – 90 min hasta que el amperaje sea constante (18mA en una cubeta de 2 geles).

Con este paso lo que se consigue es eliminar todos los iones del gel. Esto es importante porque la separación de las proteínas no se realiza por peso molecular sino por carga.

3.4.4 Electroforesis

Antes de cargar la muestra, renovar todo el tampón de ácido acético 0,9 N y lavar los pocillos con una jeringa y tampón 0,9 N de ácido acético.

Cargar las muestras previamente disueltas en tampón de muestra. La proporción correcta para ver las bandas de protaminas al gel es de 2,5 µl por carril por cada 20 µl donde hay unos 15 millones de espermatozoides.

Añadir 3 µl de tampón de muestra con verde de metileno (10mgr/100 µl; Sigma S-580104).

Correr el gel a 150V durante una hora hasta que el frente de verde de metileno se encuentre un poco por debajo de la mitad del gel.

3.4.5 Tinción de los geles

Una vez realizada la electroforesis y para poder ver las bandas de proteínas hay que teñir los geles. Para esto se utiliza una solución de BioSafe Comassie Brilliant Blue G-250 (Bio-rad; 161-0400). Por último, los geles se escanean y las bandas se cuantifican mediante un programa informático especializado. En este caso utilizamos el software empleado fue le Quantity One de Bio-Rad.

4. RESULTADOS

4.1. ARTÍCULO 1

Título: Protamine P1/P2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm

Autores: Agustín García-Peiró, Juan Martínez-Heredía, María Oliver-Bonet, Carlos Abad, María José Amengual, Joaquina Navarro, Celine Jones, Kevin Coward, Jaime Gosálvez and Jordi Benet

Publicación: Fertility and Sterility, 2011, 95(1):105-9

Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm

Agustín García-Peiró, B.S.,^{a,b} Juan Martínez-Heredia, Ph.D.,^a María Oliver-Bonet, Ph.D.,^a Carlos Abad, M.D.,^c María José Amengual, Ph.D.,^d Joaquina Navarro, Ph.D.,^a Celine Jones, B.S.,^e Kevin Coward, Ph.D.,^e Jaime Gosálvez, Ph.D.,^f and Jordi Benet, Ph.D.^a

^a Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Bellaterra, Spain; ^b Càtedra de Recerca Eugin-UAB, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ^c Servei d'Urologia, Sabadell, Spain; ^d UDIAT, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Spain; ^e Nuffield Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom; and ^f Departamento de Biología, Unidad de Genética, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Objective: To investigate the relationship between the protamine 1 to protamine 2 (P1/P2) ratio and the rate of sperm DNA fragmentation in sperm samples from human males with proven fertility and three different cohorts of male patients.

Design: P1/P2 ratio was analyzed using acid-urea polyacrylamide acid-urea gels electrophoresis (PAGE). Sperm DNA fragmentation using sperm chromatin dispersion methodology was analyzed after 0, 4, 8, and 24 hours of incubation at 37°C.

Setting: University medical school and hospital.

Patient(s): A total of 32 human males: six with proven fertility, seven carriers of chromosome reorganizations, nine clinical varicocele patients, and ten subclinical varicocele patients.

Intervention(s): None.

Main Outcome Measure(s): P1/P2 ratio, sperm DNA fragmentation (SDF) and the rate of sperm DNA fragmentation (rSDF).

Result(s): P1/P2 ratio correlated with SDF and rSDF. Statistical differences were detected between fertile controls and patients for the three pathologies studied. rSDF yielded information that differed from baseline SDF. No differences were detected for P1/P2 ratio among patient groups, in reference to the three pathologies studied.

Conclusion(s): SDF and rSDF correlates with P1/P2 ratio in human sperm, and statistical differences were detected when fertile controls were compared with three different cohorts of patients. (Fertil Steril® 2011;95:105–9. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Spermatozoa, protamine, P1/P2 ratio, DNA integrity, infertility, DNA damage

The protamines are the most abundant nuclear proteins present in mammalian sperm. Human sperm express two types of these key nucleoproteins: protamine 1 (P1) and the protamine 2 (P2) family of

proteins (P2, P3, and P4). Under normal conditions, fertile and healthy human sperm express P1 and P2 in almost identical amounts (1). However, studies of infertile human males have shown that the P1/P2 ratio deviates from that seen in normal fertile controls (2). One of the predominant functions proposed for these important sperm proteins is preserving DNA integrity in the sperm head by preventing attack from exogenous or endogenous agents (3, 4). Of particular note is that a correlation exists between P1/P2 ratio and the incidence of sperm DNA fragmentation (SDF), suggesting that this observation may be of use for clinical diagnosis in infertility clinics (5, 6).

Previous studies have established that the integrity of sperm DNA is a highly limiting factor for the correct transmission of paternal genetic information to the developing embryo (7). Because it has been further demonstrated that sperm samples from different human males can exhibit differing dynamic properties of SDF, evaluation of the rate of SDF (rSDF; SDF measured between two consecutive time points) could provide accurate information pertaining to nuclear sperm vulnerability and differential susceptibility to DNA

Received April 22, 2010; revised June 8, 2010; accepted June 16, 2010; published online July 29, 2010.

A.G-P. has nothing to disclose. J.M-H. has nothing to disclose. M.O-B. has nothing to disclose. C.A. has nothing to disclose. M.J.A. has nothing to disclose. J.N. has nothing to disclose. C.J. has nothing to disclose. K.C. has nothing to disclose. J.G. has nothing to disclose. J.B. has nothing to disclose.

A.G-P. and J.M-H. contributed equally to this work.

Supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (PI051834, PI080623), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1107), Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT) (BFU 2007-66340/BF), and Càtedra de Recerca Eugin-UAB.

Reprint requests: Jordi Benet, Ph.D., and Agustín García-Peiró, B.S., Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, Spain (TEL: 34-93-581-1773; FAX: 34-93-581-1025; E-mail: agusti.garcia@uab.es, jordi.benet@uab.es).

damage. This observation has already been demonstrated in a variety of mammalian species (8–10).

The present study aimed to determine the dynamics underlying sperm DNA fragmentation and, in particular, its potential relationship with protamine content. To achieve these objectives, P1/P2 ratio was compared with baseline SDF and rSDF in sperm from healthy fertile human males and in groups of males diagnosed with three differing pathologies of the reproductive system. In addition, we assessed the possibility that further understanding of the dynamic aspects of sperm DNA damage could provide key additional information about sperm health and subsequent potential embryo quality that is not apparent from analyses of baseline SDF alone, and such knowledge could be of value to clinical diagnosis.

MATERIALS AND METHODS

Sample Selection

Semen samples from 32 individuals (six control donors of proven fertility, seven patients who were carriers of structural chromosome reorganization, nine patients with clinical varicocele, and 10 patients with subclinical varicocele) were obtained by masturbation after 3 days of sexual abstinence. Fresh ejaculate was allowed to liquefy and was then cryopreserved. Written informed consent was given by all patients, and the study was approved by the institutional ethics committee.

Extraction of Sperm Proteins

An aliquot of semen sample containing 14×10^6 spermatozoa was washed three times with Ham's F10 1x (GibCo, Grand Island, NY). Sperm cells were then resuspended in 200 μ L of 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Sediment was then resuspended in 200 μ L of 20 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 100 mM Tris-HCl (pH 8) and processed as described previously (6). Finally, each sample was resuspended in 20- μ L buffer of 5.5 M urea, 20% β -mercaptoethanol, and 5% acetic acid.

Separation and Analysis of Sperm Proteins

Acid-urea polyacrylamide gels electrophoresis was performed on a Mini-protean System (Bio-Rad, Hercules, CA) using gels containing (final concentrations) 0.9 M acetic acid, 2.5 M urea, 15% acrylamide, 0.09% bis-acrylamide, 0.53% ammonium persulfate, and 0.53% TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Gels were prerun for 1 hour at 150 V before loading. Samples were then loaded onto the gel (2.5 μ L per sample) and separated by electrophoresis for one additional hour at 150 V in 0.9 M acetic acid buffer. Gels were stained with a solution of BioSafe Coomassie Blue G-250 (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. Finally, gels were scanned using a GS-800 scanner (Bio-Rad), and band intensity quantified with Quantity One software (Bio-Rad).

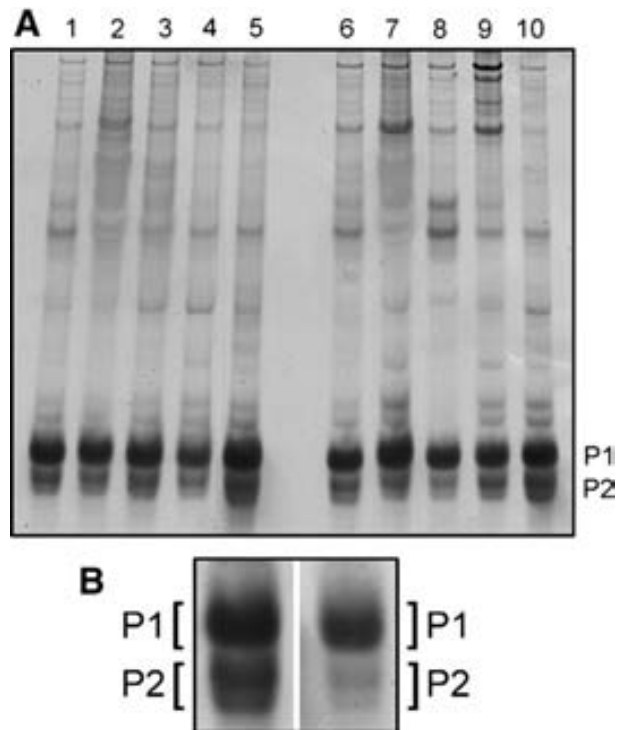
Sperm DNA Fragmentation and the Dynamics Underlying Fragmentation

An aliquot of each sperm sample was incubated at a physiologic temperature of 37°C in phosphate-buffered saline buffer. SDF, defined as the proportion (%) of fragmented sperm present among the total number of spermatozoa in the analyzed sample, was assessed after 0, 4, 8, and 24 hours of incubation (t0, t4, t8, and t24). Samples were assessed for SDF immediately after thawing (t0), and the corresponding value was considered as the baseline for each sample—SDF (t0). Values for rSDF were determined according to the following equation: $rSDF = (SDF_{t8} - SDF_{t0}) \div 8$ hours.

The Halosperm Kit (Halotech DNA SL, Madrid, Spain), which is based on the sperm chromatin dispersion test (SCDt), was used to determine sperm DNA fragmentation following commercial instructions (11). Slides were stained for fluorescence microscopy using propidium iodide (2.5 μ g/mL in Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, CA). For this study, 200 spermatozoa were scored per experimental point.

FIGURE 1

Analysis of protamine 1 (P1) and protamine 2 (P2) ratio. (A) Proteins extracted from spermatozoa, separated on a polyacrylamide-urea gel and stained with Coomassie blue. Lanes 1–5 and 6–10 correspond to different sperm samples from clinical and subclinical varicocele patients, respectively. (B) Example from a fertile donor sample with normal P1/P2 ratio (left) and a patient sample with a highly altered P1/P2 ratio (right).



García-Peiró. P1/P2 ratio and sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2011.

Statistical Analysis

Data analyses were performed using the Statistics Package for the Social Sciences software, version 15 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Values were compared using the Kruskal-Wallis test. Correlations were studied using the Pearson test. The level of significance was established at 95% of the confidence interval to be considered as statistically significant.

RESULTS

Determination of P1/P2 Ratio

Figure 1 shows analysis of P1 and P2 in human sperm samples. P1/P2 ratio was 1.2 ± 0.48 (average \pm standard deviation) and ranged from 0.5 to 1.9 in fertile control sperm (Table 1), compared with 1.85 ± 0.68 (range, 1–4.68) in sperm obtained from a group of patients suffering pathologies of the reproductive system (Fig. 2A). P1/P2 ratio was significantly higher in the group of patients than in the controls ($P=0.023$). There were no significant differences in sperm P1/P2 ratio when compared between the three pathologic conditions. P1/P2 ratio was 1.7 ± 0.46 (range, 1–2.41), 2.12 ± 1.19 (range, 1.41–4.68), and 1.72 ± 0.34 (range, 1.25–2.34) in patient groups with rearranged genome, clinical varicocele, and subclinical varicocele, respectively (Fig. 2B).

TABLE 1**P1/P2r, rSDF and SDF (t0) outcomes.**

	P1/P2r	rSDF	SDF (t0)
Control (n = 6)	1.23 ± 0.48	0.93 ± 0.30	13.00 ± 4.97
All patients (n = 26)	1.85 ± 0.68 ^a	1.84 ± 1.10 ^a	30.42 ± 9.29 ^b
Rearranged genome (n = 7)	1.70 ± 0.46	2.57 ± 1.34 ^a	19.85 ± 6.98
Clinical varicocele (n = 9)	2.12 ± 1.19	2.10 ± 1.00 ^b	34.77 ± 7.91 ^{b,c}
Subclinical varicocele (n = 10)	1.72 ± 0.34	1.09 ± 0.44 ^{d,e}	33.90 ± 5.68 ^{b,c}

Note: Values are expressed as mean ± SD. Comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test.

^a Statistical differences versus control group; $P < 0.05$.

^b Statistical differences versus control group; $P < 0.01$.

^c Statistical differences versus rearranged genome group; $P < 0.05$.

^d Statistical differences versus rearranged genome group; $P < 0.01$.

^e Statistical differences versus clinical varicocele group; $P < 0.05$.

García-Peiró. P1/P2 ratio and sperm DNA fragmentation. Fertil Steril 2011.

Determination of SDF (t0) and rSDF

Data pertaining to SDF (t0) and rSDF are also given in Table 1. SDF (t0) was significantly higher in sperm from patients (30.42 ± 9.29 ; range, 11–48) than in sperm from the control group (13.0 ± 4.97 ; range, 4–19; Fig. 2A). Statistical differences were found between both varicocele groups (clinical and subclinical) when compared with the rearranged genome group ($P < 0.01$; Fig. 2B). rSDF was significantly higher ($P = 0.033$) in sperm from the group of patients (1.84 ± 1.10 ; range, 0.62–4) than in sperm from the fertile control group (0.93 ± 0.30 ; range, 0.5–1.37; Fig. 2A). rSDF in the rearranged genomes and clinical and subclinical varicocele patients was 2.57 ± 1.34 (range, 0.75–4), 2.10 ± 1.10 (range, 1.25–4), and 1.09 ± 0.44 (range, 0.62–1.87), respectively. Statistical differences were detected between the subclinical varicocele patients and both the clinical varicocele and rearranged genome groups ($P < 0.05$). No statistical differ-

ences were found between patients with a rearranged genome and those diagnosed with clinical varicocele (Fig. 2B).

Correlation of P1/P2 Ratio with rSDF and SDF (t0)

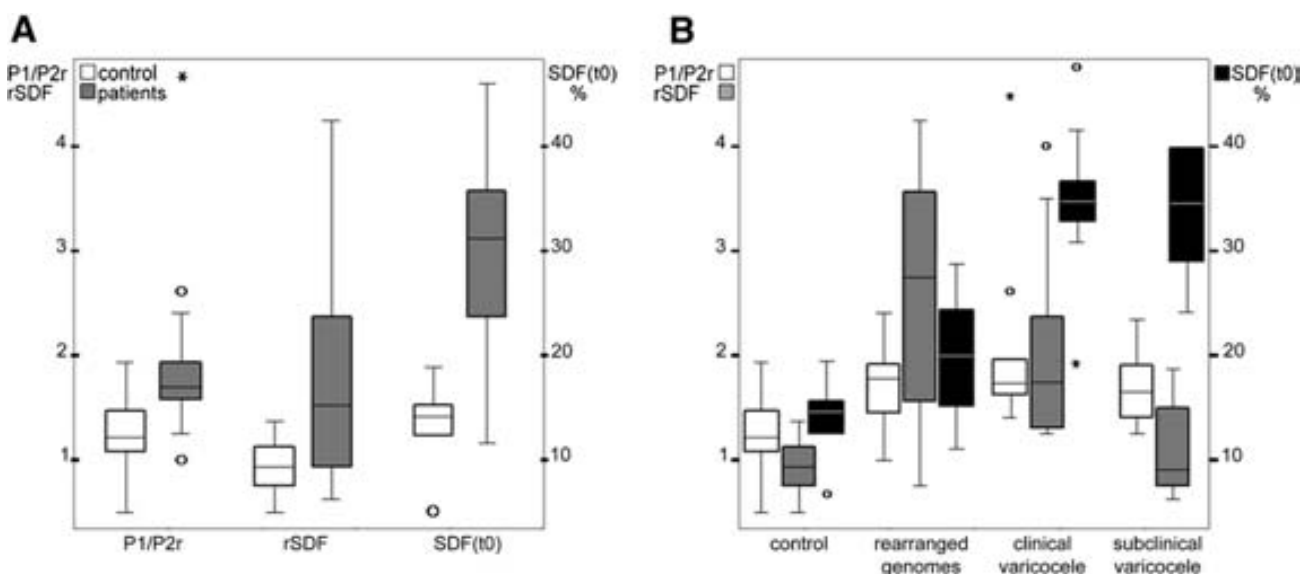
Analyses showed that the P1/P2 ratio was correlated with SDF at t0 ($r = 0.424$; $P = 0.015$). However, a stronger correlation was detected between the P1/P2 ratio and rSDF ($r = 0.525$; $P = 0.002$), suggesting that the latter relationship was of more use to the development of new clinical diagnostic assessments.

DISCUSSION

The results of the present study strongly indicate that the dynamic assessment of sperm DNA fragmentation may provide new insight to our understanding of the loss of sperm DNA quality, a sperm

FIGURE 2

Box-and-whisker plots showing (A) differences between control and patients groups for P1/P2 ratio, rSDF, and SDF (t0) and (B) differences between control, rearranged genome, and clinical and subclinical varicocele groups for P1/P2 ratio, rSDF, and SDF (t0).



García-Peiró. P1/P2 ratio and sperm DNA fragmentation. Fertil Steril 2011.

characteristic that remains hidden when only baseline SDF is considered. In the present experimental approach, we have demonstrated that both SDF and rSDF correlate with P1/P2 ratio. Correlation between baseline DNA damage and protamine content in sperm has been determined previously by Manicardi et al. (12) using chromomycin A3 staining. This correlation was confirmed using similar experimental approaches by several other authors (13–15). Direct correlations between P1/P2 ratio and baseline SDF were reported by Aoki et al. (5) and Torregrosa et al. (6) using different experimental approaches such as the sperm chromatin structure assay and the TUNEL assay. The use of the SCDt also demonstrates that when the P1/P2 ratio is altered, SDF is increased. Using this methodology, we were able to demonstrate that rSDF is also correlated with P1/P2 ratio, and more importantly, that this correlation was higher than that obtained for SDF when assessed at t0. This finding is of great interest because these results indicate that any imbalance in P1/P2 ratio may render the sperm more susceptible to stressors. It is evident that the level of DNA damage produced when spermatozoa are confronted by a multistep and potentially aggressive methodology, such as sperm selection for assisted reproductive technologies (ART), may be the result of a synergistic process, whereby the level of damage in each step is reinforcing the damage produced in the next. Consequently, the immediate hypothesis to test would be that the highest imbalance in P1/P2 ratio will render the highest levels of rSDF, thus yielding sperm with compromised potential to create a viable embryo. The confirmation of this observation may be of great significance in common and established assisted reproduction technique protocols when using ejaculated sperm samples for controlled clinical procedures. Future studies should critically analyze sperm selected via such protocols for downstream clinical application and relate such sperm to P1/P2 ratio, SDF, and rSDF. Moreover, even under natural conditions devoid of clinical intervention, the sperm that survive the stressful passage in the first part of the female tract may have fewer opportunities for deleterious effects on DNA integrity. Sperm must reach and make contact with the cervical mucus and enter the cervix; only then can the sperm fraction exhibiting adequate biologic characteristics reach the fallopian tubes with the physiologic potential to fertilize an oocyte. In such competitive and potentially aggressive environments, the fraction of sperm that is maintained in a fully functional state by connecting with endosalpingeal epithelium must maintain an orthodox DNA molecule with fully physiologic capacity for fertilization (16, 17), and this could depend on the P1/P2 ratio.

P1/P2 Ratio in Sperm From Fertile Controls and Patient Groups Exhibiting Pathology of the Reproductive System

The present study detected a statistically elevated P1/P2 ratio and SDF in patients exhibiting pathologies of the reproductive system compared with healthy fertile controls. These results concur with earlier studies by other authors (1, 18). Studies have attempted to establish the prognostic values of these variables for pregnancy outcome (2, 7, 19, 20). However, the conclusions of these investigative studies remain controversial, because other authors report conflicting results (21–23). The present results show that statistical differences in rSDF are detectable between control and patient cohorts. However, until recently, studies have failed to incorporate patients exhibiting reproductive anomalies in their analyses. It has been reported that in human males of proven fertility, sperm DNA experience significant elevations in SDF, which can be variable in intensity when compared with different individuals (9). Interestingly, the tendencies

for increased elevations in SDF can be logarithmic, linear, or exponential (10). This finding indicates that some individuals may exhibit a more intense rSDF than others, and conversely some sperm samples may be more resistant to DNA fragmentation than others (9).

P1/P2 ratio has not been determined previously in the three patient subgroup types included in the present study. However, our results are in agreement with formerly published values for fertile male and infertile patients (2, 19). We did not detect statistical differences for P1/P2 ratio when the three patient subgroups were analyzed. However, the highest values of P1/P2 ratio were recorded in the clinical varicocele group. This finding can be explained if we consider that a drastically altered P1/P2 ratio is normally associated with a reduction in the levels of P2 concurrent with elevated levels of the pre-P2 precursor form (1). A common feature of varicocele is increased testicular temperature and elevated levels of oxidative agents (24, 25). Evenson et al. (26), however, reported that thermal stress does not influence P1/P2 ratio. However, De Iuliis et al. (14) described a direct relationship between oxidative stress and chromatin remodeling. Therefore, it is reasonable to postulate that oxidative stress may be a factor that affects P1/P2 ratio in a manner yet to be described. However, this interpretation needs to be confirmed by future work addressing a larger number of appropriate patient samples.

Rearranged Genomes

Carriers of a rearranged genome are characterized by an increased risk of unbalanced sperm production, which in some cases could lead to infertility (27, 28). A number of different reports have reported that carriers of a rearranged genome exhibit increased levels of sperm DNA fragmentation (29, 30). However, we failed to detect any statistically differences, although the *P* value was close to statistical significance ($P=0.06$). We speculate that this effect is not apparent in our study, owing mainly to a relatively low sample size. We need to highlight that in some of the patients of this study, the level of SDF at t0 would be considered as being normal by some authors (7, 31). The situation is different when the rSDF was analyzed; the rSDF average for the rearranged genome group was the highest of all patient subgroups (Table 1).

Varicocele

Varicocele is defined as the dilation of the pampiniform plexus of the internal spermatic veins, and it is one of the main causes of male infertility (32). Depending on its severity, and although its diagnosis remains controversial, we have distinguished a subclinical varicocele condition, which is less intense and diagnosed by ultrasound examination. Clinical varicocele, however, is more severe and can be diagnosed by physical examination. The results obtained in regard to the level of SDF at t0 in the present study are also consistent with published data (33–35). To our knowledge, there are no earlier reports concerning DNA fragmentation in the subclinical varicocele condition. Our current data demonstrate that both varicocele patient groups (clinical and subclinical) exhibit an increased and statistically significant level of SDF when compared with the control group. No differences were detected between the subclinical and clinical varicocele patients. Nevertheless, when dynamic aspects of SDF were considered by determining rSDF, we detected differences between the two varicocele groups. No differences in rSDF were found between the control group and the subclinical varicocele cohort, whereas the clinical varicocele group differed statistically when compared with the control and subclinical groups. Moreover, it is interesting to note that basal SDF levels for clinical and subclinical groups were similar, but

the increasing rate of sperm DNA damage was higher in patients with clinical varicocele. This finding could be related to the higher levels of ROS associated with the clinical varicocele condition (36).

Baseline levels of SDF evaluated at t0, along with rSDF, correlates with the P1/P2 ratio determined from individual patients. Evaluation of dynamic aspects of SDF offers significant new insight into our understanding of the potential capacity of a sperm sample to achieve fertilization when used in

assisted reproductive technique treatments such as intrauterine insemination or in vitro fecundation (IVF). Furthermore, detailed evaluation of rSDF may provide important information concerning the specific use and temporal windows in which we must handle sperm samples for ICSI, intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI), or alternative procedures for sperm selection.

Acknowledgment: We thank Sara de Mateo for technical assistance.

REFERENCES

1. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12:417–35.
2. de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, et al. Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril* 2009;91:715–22.
3. Sotolongo B, Lino E, Ward WS. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod* 2003;69:2029–35.
4. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;21:33–44.
5. Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005;26:741–8.
6. Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, et al. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 2006;21:2084–9.
7. Evenson DP, Wixon R. Data analysis of two in vivo fertility studies using sperm chromatin structure assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2008;90:1229–31.
8. López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 2007;68:1240–50.
9. Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Nuñez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril* 2009;92:170–3.
10. Gosálvez J, de la Torre J, López-Fernández C, Pérez-Gutiérrez L, Ortega L, Caballero P, et al. DNA fragmentation dynamics in fresh versus frozen thawed plus gradient-isolated human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med* 2010;56:27–36.
11. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2005;84:860.
12. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995;52:864–7.
13. Plastira K, Msaouel P, Angelopoulou R, Zanioti K, Plastiras A, Pothos A, et al. The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:437–43.
14. De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009;81:517–24.
15. Nili HA, Mozdarani H, Aleyasin A. Correlation of sperm DNA damage with protamine deficiency in Iranian subfertile men. *Reprod Biomed Online* 2009;18:479–85.
16. Hawk HW. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. *J Dairy Sci* 1987;70:1487–503.
17. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 2006;12:23–37.
18. Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2009;32:46–56.
19. Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, et al. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril* 2006;86:1408–15.
20. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 2010;33:e221–7.
21. Bungum M, Spanò M, Humaidan P, Eleuteri P, Rescia M, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART. *Hum Reprod* 2008;23:4–10.
22. Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008;90:352–9.
23. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008;89:823–31.
24. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl* 2008;29:488–98.
25. Lima SB, Cenedeze MA, Bertolla RP, Filho PA, Oehninger S, Cedeno AP. Expression of the HSPA2 gene in ejaculated spermatozoa from adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril* 2006;86:1659–63.
26. Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 2000;21:739–46.
27. Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:281–90.
28. Martin RH. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* 2008;14:379–90.
29. Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, et al. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2006;21:685–93.
30. Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, et al. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril* 2009;92:583–9.
31. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20:3446–51.
32. Lee J, Binsaleh S, Lo K, Jarvi K. Varicoceles: the diagnostic dilemma. *J Androl* 2008;29:143–6.
33. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005;84:833–42.
34. Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl* 2006;27:106–11.
35. Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF, Veldhoven JL, Weber RF, Dohle GR. Decreased sperm DNA fragmentation after surgical varicocelectomy is associated with increased pregnancy rate. *J Urol* 2010;183:270–4.
36. Pasqualotto FF, Sharma RK, Pasqualotto EB, Agarwal A. Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Urol Int* 2008;81:263–70.

4.2. ARTÍCULO 2

Título: Sperm DNA integrity and meiotic behavior assessment in an infertile male carrier of a 9qh+++ polymorphism

Autores: Agustín García-Peiró, María Oliver-Bonet, Joaquina Navarro, Carlos Abad, Miriam Guitart, María José Amengual and Jordi Benet

Publicación: Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011:730847

Research Article

Sperm DNA Integrity and Meiotic Behavior Assessment in an Infertile Male Carrier of a 9qh+++ Polymorphism

A. García-Peiró,^{1,2} M. Oliver-Bonet,^{1,3} J. Navarro,¹ C. Abad,⁴ M. Guitart,⁵
M. J. Amengual,⁵ and J. Benet¹

¹Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

²Càtedra de Recerca Eugin-UAB, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

³Unitat d'Investigació Hospital Universitari Son Dureta, 07014 Palma de Mallorca, Spain

⁴Servei d'Urologia, Consorci Hospitalari Parc Taulí, 08208 Sabadell, Spain

⁵UDIAT, Consorci Hospitalari Parc Taulí, 08208 Sabadell, Spain

Correspondence should be addressed to A. García-Peiró, agusti.garcia@uab.es and J. Benet, jordi.benet@uab.cat

Received 5 August 2010; Revised 29 October 2010; Accepted 1 November 2010

Academic Editor: Paul W. Doetsch

Copyright © 2011 A. García-Peiró et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Although several reports on male infertility suggest a relationship between chromosome 9 polymorphisms and infertility, the effects on the phenotype have not been extensively reported. In this study, an infertile patient was found to carry a 9qh+++ chromosome. The flow cytometric TUNEL assay and SCD test have been applied to characterize sperm DNA integrity. In order to assess its meiotic behaviour, synapsis, recombination, and aneuploidy, analyses have been also performed. Sperm DNA fragmentation (SDF) was 77.81% and 87% for the TUNEL and SCD tests, respectively. Ninety-two percent of pachytene cells analyzed showed meiotic abnormalities. The mean number of MLH1 foci per pachytene in the control group was higher (49) than the mean found in the 9qh+++ patient (38) ($P < .0001$). In spermatozoa, significant increases of disomy rates were observed for chromosome 18 and for the sex chromosomes ($P < .0001$). These disturbances could be present in other male carriers of a less marked 9qh+.

1. Introduction

In the last few years, some papers have reported a high incidence of heterochromatin variants in infertile men [1–3]. Paracentric heterochromatin variants usually occur on the long arms of chromosomes 1, 9, 16, and distal heterochromatin of the Y chromosome [1]. In particular, the heterochromatin polymorphism of chromosome 9 is the structural variant most frequently present in infertile men [2, 3]. In this respect, some authors have suggested that the presence of some heterochromatin polymorphisms may make synapsis difficult, delaying or even preventing it and, as a consequence, may cause the reduction in both sperm number and quality, impairing the fertility of the patient [4].

More recently, several studies have shown that sperm DNA integrity is a highly limiting factor for the correct

transmission of paternal genetic information. This could disturb both the fertilization and embryo-development processes [5, 6]. While recent data about sperm DNA integrity in balanced chromosomes rearranged carriers have been published [7, 8], no data from carriers of heterochromatin polymorphism have been published to-date so, consequently, a lack of information about the effects on the phenotype is still present. In order to fill, at least in part, this gap, meiotic, aneuploidy, and sperm DNA integrity analyses have been performed in a carrier of the polymorphic 9qh+++ variant.

2. Material and Methods

2.1. Donor and Sample Treatment. The donor is a 36-year-old infertile male with severe oligoasthenoteratozoospermia.

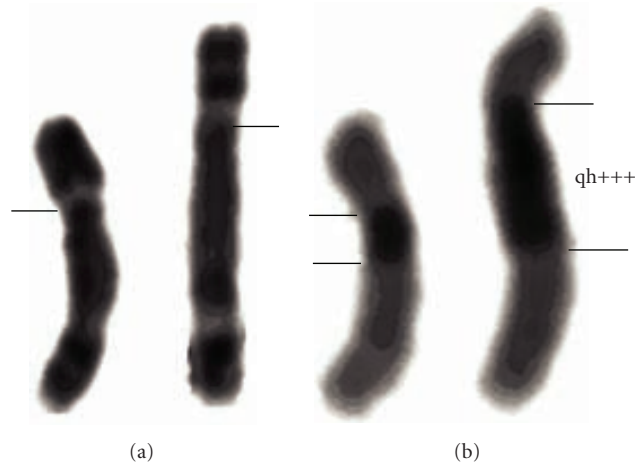


FIGURE 1: Karyotype analysis shows a 9qh+++ heterozygous state. (a) G-banding of homologous 9 chromosomes. Abnormal chromosome 9 (right) showing an increased length in the q arm compared to its homologous chromosome (left). Horizontal line indicates centromere position. (b) C-banding shows an increase in the heterochromatin region of chromosome 9. Horizontal lines set the limits of the qh region.

Physical examination showed testes with a slightly diminished volume and consistency. Hormonal assays showed FSH and LH within normal levels. According to World Health Organization recommendations [9], sperm count was estimated to be 2.8 million per mL. No sperm with progressive motility was observed and only 3% of sperm showed nonprogressive motility. Standard protocols for G- and C-banding analysis were performed on lymphocyte metaphases showing the presence of a 9qh+++ chromosome in which the pericentromeric heterochromatin block tripled the normal length (Figure 1).

For synapsis and recombination analyses, a testicular biopsy was obtained from the patient and five control men, undergoing vasectomy or reversal vasectomy, under a local anaesthesia [10]. To perform DNA integrity tests and the aneuploidy study, a semen sample from the patient and three control men of proven fertility was obtained by masturbation after three days of sexual abstinence. Written consent was given by all patients, and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

Fresh ejaculate was allowed to liquefy, mixed 1:1 with cryopreservation medium (14% (v/v) glycerol, 30% (v/v) egg yolk, 1.98% (w/v) glucose, and 1.72% (w/v) sodium citrate), aliquoted and incubated overnight at 80°C in an isopropanol bath and then plunged directly into liquid nitrogen until the experiment was performed.

For synapsis and recombination analyses, a modification of the drying-down technique [11] was used to obtain meiotic cells from the testicular tissue. Briefly, the tissue was incubated for an hour at room temperature in a hypotonic solution (sodium citrate 1% (w/v)). After incubation, 20 μ l of 0.1 M sucrose solution were added to the tissue and testicular tubules were shredded using two fine watchmaker forceps until a cell suspension was obtained. This cell suspension was then recovered and spread on a slide previously soaked in 1% (w/v) paraformaldehyde. The slide was placed in a humid chamber and allowed to dry overnight. Finally, the

slide was washed in 0.04% (v/v) Photo-Flo (Eastman Kodak SA; Genève, Switzerland) for 4 min at room temperature and air-dried.

2.2. TUNEL Assay. For terminal transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL), the *in situ* cell death detection kit, from Roche (Ref. 11684795910, Roche Diagnostic GmbH; Penzberg, Germany), was used as previously described [12]. This assay quantifies, by flow cytometer or fluorescent microscopy, the incorporation of labeled deoxyuridine triphosphate (dUTP) at the sites of DNA breaks in a reaction catalyzed by the enzyme deoxynucleotidyl transferase enzyme. Semen samples from the patient and three fertile and chromosomally normal donors were washed twice in PBS and the concentration was adjusted to 20×10^6 cells/mL. Two-hundred microliters of this sperm suspension were fixed an equal volume of 4% (w/v) paraformaldehyde for 1 hour at room temperature and then washed in PBS supplemented with 1% (v/v) bovine serum albumin (BSA; Sigma Chemicals). Sperm cells were permeabilized using 0.1% (v/v) Triton X-100 in 0.1% (w/v) sodium citrate for 2 minutes in ice and then washed twice in PBS supplemented with 1% BSA. The pellet was incubated in 50 μ L of a mix containing 45 μ L of the label solution plus 5 μ L of the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme for 1 hour at 37°C in the dark. The sample was then washed twice using 1% BSA in PBS. The negative control was incubated without the TdT enzyme and the positive control was prepared before the labeling reaction with an additional treatment with DNase I (Roche Diagnostic GmbH; Penzberg, Germany), 100 IU, for 10 minutes at 37°C.

In order to perform flow cytometry analysis, the final pellet from the sperm sample was resuspended in a final volume of 1 mL PBS. Green fluorescence (TUNEL-positive cells) was measured using a 530 nm \pm 30 nm band-pass filter. A total of 10 000 events were measured at a flow rate of

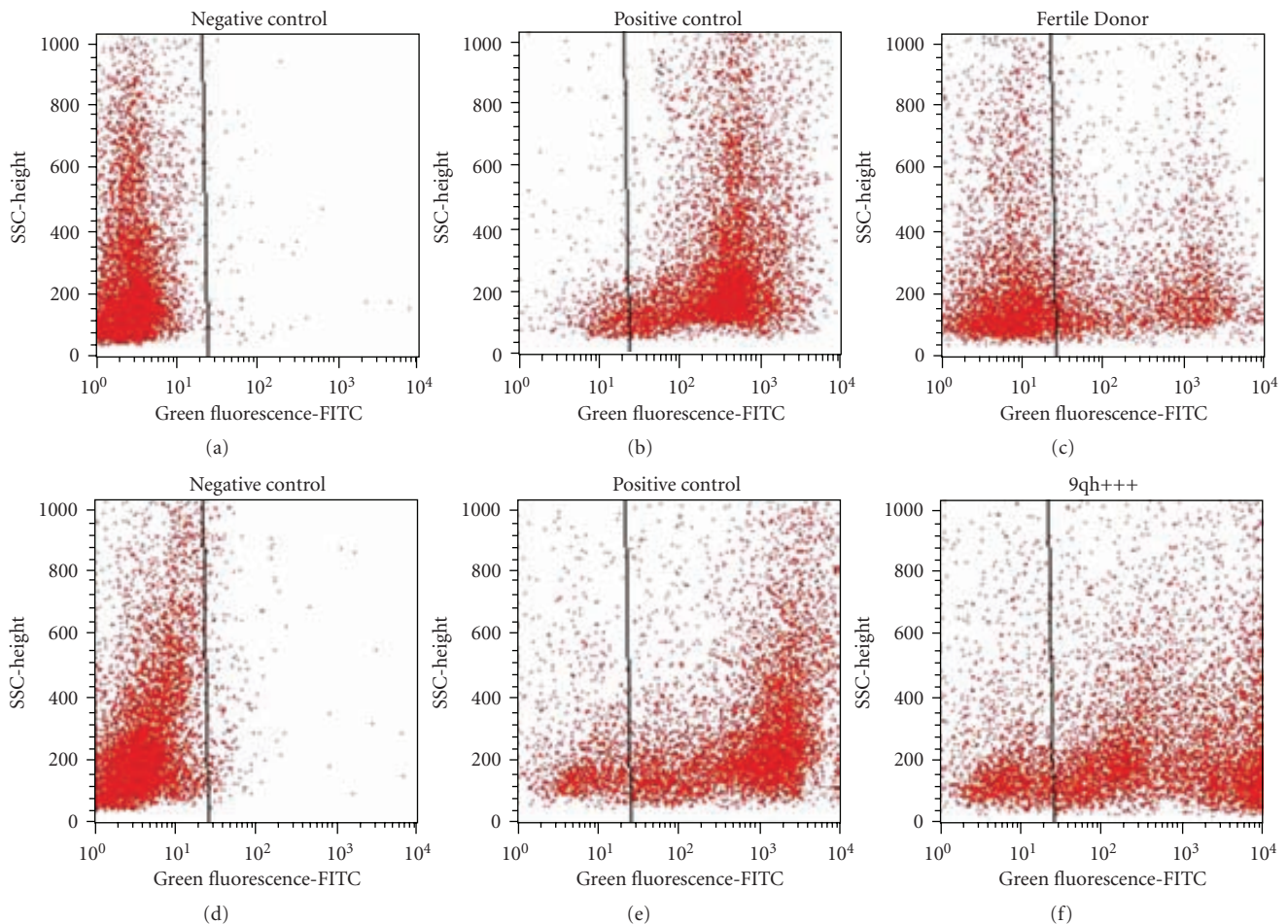


FIGURE 2: Cytogram for TUNEL. (a, d) The negative control was incubated without the TdT enzyme. (b, e) Positive control was prepared before the labeling reaction with an additional treatment with DNase I. (c, f) The TUNEL-positive cell in the fertile donor and patient sample was measured, respectively, with respect to the negative-control sperm population using a 530 nm \pm 30 nm band-pass filter. A total of 10 000 events were measured at a flow rate of 200–300 cells/s on a flow cytometer.

200–300 cells/s on a flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, NJ, USA). Data were processed by CELLQUEST analysis software (Becton Dickinson).

2.3. SCD Test. For the Sperm Chromatin Dispersion test (SCDt), the Halosperm kit was used (Chromacell SL; Madrid, Spain). The SCD test is based on the principle that sperm with fragmented DNA fails to produce the characteristic halo of dispersed DNA loops that is observed in nonfragmented DNA sperm [13]. The semen samples from the patient and from three fertile and chromosomally normal donors were washed twice in PBS and the concentration was adjusted to 20×10^6 cells/mL. Low-melting-point agarose was melted in a water bath at 90°C–100°C for 5 min and placed in water at 37°C for 5 min to allow for equilibration. Then, 60 μ L of the semen sample were mixed with agarose and 20 μ L of the semen-agarose mixture were pipetted onto an agarose-coated slide, covered with a coverslip and left at 4°C for 5 min. The coverslip was gently removed and immersed in an acid solution for 7 min, washed for 5 min with

distilled water, and incubated in 10 mL of the lysing solution for 25 min. After washing, the slides were dehydrated in 70%, 90%, and 100% ethanol for 2 min each and then air-dried. Slides were stained for fluorescence microscopy using DAPI (2 μ g/mL) (Roche Diagnostics; Barcelona, Spain) in Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame, CA). The positive control was prepared with an additional treatment with DNase I (Roche Diagnostic GmbH; Penzberg, Germany), 100 IU, for 10 minutes at 37°C. For this study, 300 spermatozoa were scored and the percentage of sperm with fragmented DNA is referred to as sperm DNA fragmentation (SDF).

2.4. Sperm Aneuploidy Study. The sperm aneuploidy study was carried out using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Frozen samples from three fertile control donors and the patient were thawed in a 37°C bath for 30 seconds and then washed in 0.9% (w/v) NaCl to remove the cryoprotectant, fixed, and decondensed following a protocol previously described [14]. Three-color FISH was

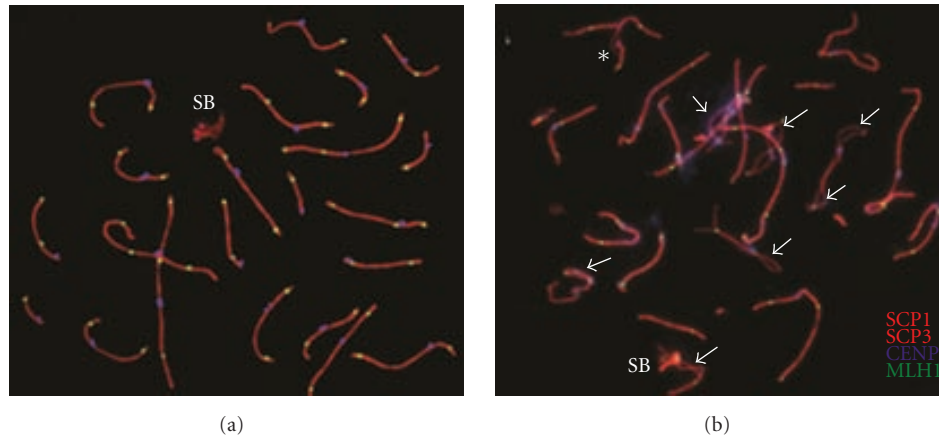


FIGURE 3: Immunolabeled pachytene cells with synaptonemal complexes. (a) Representative image from the control group showing the normal morphology of the synaptonemal complex and sex body (SB). (b) Representative image of the cytological analysis of the patient's cells. Arrowheads indicate multiple asynaptic regions in the autosomal synaptonemal complex; an asterisk indicates a loop of asynapsis as a consequence of pericentromeric heterochromatin polymorphism of chromosome 9. SCP1 and SCP3 indicate synaptonemal complexes in red; CENP indicates centromere in blue, and MLH1 (mut L homolog 1) indicates recombination foci in green.

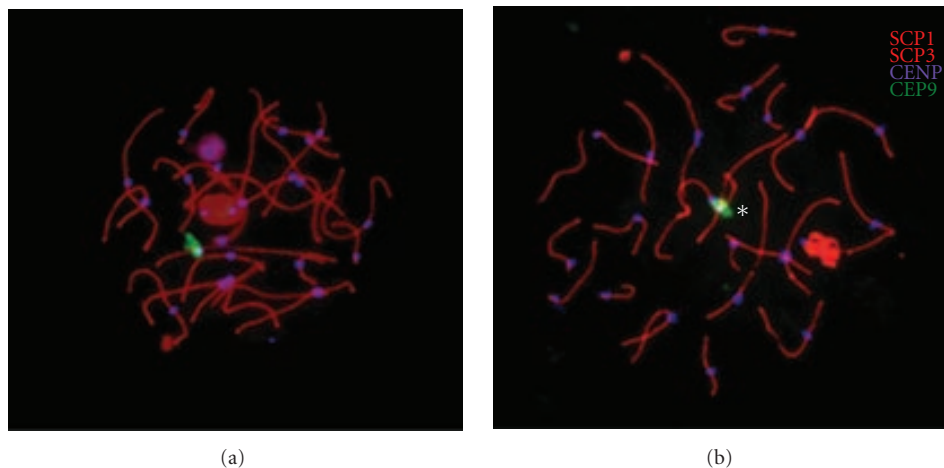


FIGURE 4: Images show pachytene cells with the bivalent 9 synaptonemal complex identified by FISH analysis. (a) Representative image from a control donor. (b) Representative image from the 9qh+++ patient. An asterisk indicates the loop in the pericentromeric region; SCP1 and SCP3 indicate synaptonemal complexes in red; CENP indicates centromere in blue, and chromosome enumeration probe 9 (CEP9) indicates bivalent 9 in green.

performed with a combination of centromeric probes for chromosomes 18, X, and Y. Following the protocol recommended by the commercial provider (AneuVysion EC DNA Probe Kit; Vysis Inc; Woodcreek, IL, USA), slides were denatured for 5 min in a 70% (v/v) formamide 2x standard saline citrate (2xSSC) solution prewarmed at $70\% \pm 1^\circ\text{C}$ in a waterbath, passed through three ethanol series (70%, 90%, 100%) and air-dried. Five μl of the denatured mixture were applied to each slide, and 18 mm \times 18 mm coverslips were added and sealed with rubber cement. Slides were incubated overnight at 37°C . After incubation, slides were washed following the manufacturer's instructions, dehydrated, and counterstained with antifade (Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, USA) containing DAPI

at a concentration of 0.032 ng/mL (Sigma; Madrid, Spain). Hybridization signals were observed using an Olympus Bx60 photomicroscope (Olympus Optical Co.; Hamburg, Germany) with a triple filter for DAPI/FICT/PI. Images were captured and produced by a Cytovision system (Applied Imaging; Sunderland, UK).

From three control donors, a total of 31 134 spermatozoa were scored. Moreover, 616 spermatozoa were scored from the 9qh+++ patient. Strict criteria were applied: only individual, well-delineated and intact sperm nuclei were evaluated, and a sperm head was scored as disomic when it displayed two clear signals for the same chromosome, which were of similar size, color and intensity, and separated by at least one fluorescence domain.

2.5. Synapsis and Recombination Study. Immunocytology of spermatocytes from the control group and the patient sample was performed following Barlow and Hulten [15]. Four primary antibodies were used: rabbit anti-synaptonemal complex protein-3 (SCP3) [16] and rabbit anti-SCP1 [17] (both gifts from Dr. Christa Heyting, University of Wageningen, The Netherlands), anti-centromere protein (CENP) (CREST serum kindly provided by Dr. William Earnshaw), and mouse anti-MLH1 protein (Pharmingen; San Diego, CA, USA). The four primary antibodies were applied at 1:1000, 1:1000, 1:1000, and 1:500, respectively, in PBT (PBS, 0.15% (v/v) Fetal Calf Serum, 0.1% (v/v) Tween 20) overnight at room temperature. Fluorescence secondary antibodies were applied in two rounds. The first round included a combination of TRITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (both from Sigma; Madrid, Spain) at 1:500 in PBT for 2 h at room temperature. The last round was performed using the Zenon Pacific Blue Rabbit IgG Labeling Kit (Molecular Probes, Spain) to label an unconjugated rabbit anti-human antibody. Incubation time was 40 minutes at room temperature. After three 5-minute washes in PBT and a brief rinse in distilled water, slides were allowed to air-dry. Antifade (Vector lab Inc; Burlingame, CA, USA) was applied to each slide. Evaluation was made using a fluorescent photomicroscope (Olympus Optical Co.; Hamburg, Germany) and all observed pachytene nuclei with anti-MLH1 antibody foci were captured and processed using a Power Macintosh G3 with SmartCapture software (Digital Scientific; Cambridge, UK).

2.6. Chromosome 9 FISH. A specific CEP9 SpectrumGreen probe (Vysis, Abbott Molecular Inc; Des Plaines, IL, USA) was used for the bivalent 9 identification. The spectrum green probe was hybridized on previously immunostained preparations. Briefly, slides were washed with 2xSSC pH 7.0 for two minutes, after which they were dehydrated in an ethanol series (70%, 85%, and 100%), each one for two minutes, and dried at room temperature. Denaturalization of the sample was performed in 70% formamide for 3 min at 73°C and probe solution was denatured for 5 min at 73°C. Hybridization was performed in a humid lightproof container at 37°C overnight. After hybridization, the slides were washed in 0.4xSSC/0.3% NP40 at 74°C for two minutes followed by a second wash with 2xSSC/0.01% NP40 at room temperature for 30 seconds. Finally, DNA was counterstained by applying antifade solution containing 125 ng/ μ l of DAPI. Identification was performed using a fluorescent photomicroscope (Olympus Optical Co.; Hamburg, Germany) equipped with the ISIS digital FISH-imaging system (MetaSystems; Altusheim, Germany).

2.7. Statistical Analysis. The Chi-Square test and Fisher test were applied when needed for qualitative data analysis to determine whether there were significant differences between two groups for the MLH1, aneuploidy percentages of chromosomes X, Y, and 18 and sperm DNA fragmentation variables. The Student's *t*-test and U-Mann-Whitney test

TABLE 1: Percentages of sperm with DNA fragmentation in semen of a heterochromatin polymorphism carrier and control group of fertile donors.

	Patient	Control ($n = 3$)	<i>P</i> value
TUNEL ^a	77.81%	15.6%	$P < .0001$
SCD ^b	87%	10.33%	$P < .0001$

^{a,b} For the 9qh+++ carrier, 10000 and 300 spermatozoa were analyzed for TUNEL and SCD, respectively. For controls, 30000 and 900 sperm cells were analyzed.

TABLE 2: Values obtained for asynapsis in pachytene cells in the heterochromatin polymorphism carrier.

	Normal	Anomalous		
Synapsis ^a	8%	92%		
		Only in chromosome 9	Chromosome 9 and others	Only in others
		40%	32%	20%

^a The presence of synaptonemal complex abnormalities was analyzed in 50 pachytene cells.

were applied to quantitative data comparisons. A value of $P < .05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Sperm DNA Damage Analysis. DNA fragmentation was high regardless of the method applied: 77.81% and 87% SDF for the flow cytometric TUNEL assay (Figure 2) and the SCD test, respectively. In the control group ($n = 3$), a mean of 15.6% and 10.53% was found for the TUNEL and the SCD tests, respectively. Statistical differences were found ($P < .0001$) between the SDF values of this patient and those of the control group (Table 1).

3.2. Synapsis Analysis. Figure 3 shows the immunocytogenetic analysis. The presence of asynapsis, SC fragmentation and XY association was evaluated for all autosomal SCs in 50, 224, and 213 pachytene nuclei in the 9qh+++ carrier and in two control groups [4, 10], respectively. Table 2 shows the frequencies of synapsis disturbances observed in pachytene cells of the 9qh+++ carrier. We found that 92% of the analyzed spermatocytes presented some of these abnormalities. Of them, 40% of the cells presented asynapsis only in chromosome 9, whereas 32% presented asynapsis in chromosome 9, plus SC fragmentation, asynapsis in other chromosomes, or XY association with autosomes. Finally, 20% of the cells presented complete synapsis of chromosome 9, but there were different alterations affecting other SCs. In the control group, a total of 11.7% of unsynapsed bivalent regions (splits) were seen. Observed ranges were from 2.4% to 29.2% [10]. Differences regarding asynapsis frequency for bivalent 9 were found between the patient and the control group [4] (Figure 4 and Table 3).

3.3. MLH1 Foci Analysis. For recombination analysis, a total of 43 pachytene nuclei were studied and the number of

TABLE 3: Number and percentage of asynapsis and heterosynapsis found according to the different pachytene stages analyzed for bivalent 9.

Stage	Control ^a (<i>n</i> = 213)		Patient 9qh+++ (<i>n</i> = 50)			
	Asynapsis in 9q		Asynapsis in 9q		Heterosynapsis in 9q	
	<i>n</i> = 43	%	<i>n</i> = 36	%	<i>n</i> = 14	%
Early	30	14.1	11	22	3	6
Late	13	6.1	20	40	7	14
Unknown	—	—	5	10	4	8
Total (%)		20.2		72		28

^aCodina-Pascual et al., [4]

MLH1 foci was scored per cell. A significant reduction in the MLH1 foci number has been found in the 9qh+++ when compared with our controls ($P < .0001$). The mean number of MLH1 foci per cell observed in controls was 48.8 ± 2.3 , and ranged from 36 to 63 foci per cell, whereas a mean of 38 ± 8.28 foci per cell was found in the 9qh+++ ranging from 12 to 50 foci per cell.

3.4. Aneuploidy Assay. A total of 616 sperm from the 9qh+++ carrier and 31,134 sperm from the control group ($n = 3$) were analyzed by triple-color FISH. Significant differences were found between these two groups for sex disomies, autosomal disomies of chromosome 18, and diploidy ($P < .0001$). Results are summarized in Table 4.

4. Discussion

In the present report, a less common variant of chromosome 9 polymorphism has been analyzed, and new evidence that correlates with infertility is provided. The karyotype of the patient showed an enlarged pericentromeric heterochromatin block which triples its normal length, with regards to its homologous chromosome (Figure 1). Significant meiotic alterations, anomalous aneuploidy rates, high-sperm DNA fragmentation, and altered seminogram parameters have been found.

In the clinical examination, the patient showed an impaired fertility status but no other pathologies. Therefore, the occurrence of a polymorphism of such significance seems to have a strong effect on the germ cells, but not on somatic cells. It seems that asynapsis is a determining aspect for the origin of germ-cell collapse [18, 19]. Thus, the presence of a threshold amount of asynapsed regions could be a sign of abnormal meiotic progression and could trigger apoptosis [4]. In this patient, synaptic disturbances in 92% of the analyzed pachytene cells were found. Similar results were reported by Solari et al. [20] in their previous work, where all early pachytene cells presented loops of asynapsis in chromosome 9, which disappeared at late-pachytene, probably because of synaptic adjustment. In our case, a high percentage of late-pachytene stage cells (40%) presented important loops of asynapsis at the pericentromeric region of chromosome 9 (Figure 4(b) and Table 3) probably because the heterochromatin polymorphism is extremely large and the heterologous pairing could not compensate the impairment in time and extension.

TABLE 4: Aneuploidy percentages of chromosomes X, Y, and 18 in the heterochromatin polymorphism carrier and in a chromosomally normal control group.

	Patient ^a	Control ^b	<i>P</i> value
<i>Sex disomies</i>			
X,X	1.3%	0.04–0.09%	<0.0001**
Y,Y	1.1%	0.06–0.14%	<0.0001**
X,Y	1.4%	0.14–0.32%	<0.0001**
<i>Autosomal disomies</i>			
18,18	0.9%	0.09–0.17%	<0.0001**
Diploidy	2.6%	0.15–0.31%	<0.0001**

^{a,b}616 and 31134 spermatozoa were analyzed, respectively.

We have also analyzed the frequencies of MLH1 foci and sperm aneuploidy for standard chromosomes X, Y, and 18 in the patient and in chromosomally normal controls. In the patient, a significantly low frequency of MLH1 and an increase of aneuploidy for all chromosomes analyzed were found (Table 4). It is generally accepted that abnormal meiotic recombination is associated with aneuploid sperm production because crossing-over is necessary for proper chromosome segregation [21]. A recent report has shown a correlation between meiotic recombination and testicular sperm aneuploidy in the same individual [22].

Concerning DNA integrity, a significant increase in the number of sperm with DNA fragmentation was seen in the patient in comparison with fertile donors (Table 1 and Figure 2). Furthermore, in other infertile patients with different pathologies of the reproductive system, such as varicocele, and even in patients with chromosomal rearrangements, the values of SDF were statistically lower than those observed in this particular case [8]. The principally known causes of DNA fragmentation are apoptosis during the process of spermatogenesis; DNA strand breaks produced during the remodeling of sperm chromatin in spermiogenesis, and DNA fragmentation induced by oxygen radicals [23, 24]. In this case, apoptosis could be the main cause of DNA damage at the testicular level, thus explaining the low count of sperm cells found in the seminogram. However, other causes could be responsible for sperm DNA damage. The remodeling of sperm chromatin, the histone-protamine transition, is an exclusive spermiogenetic cellular process that occurs during the round-spermatid to long-spermatid stage. As the integrity of DNA and chromatin depends, in part, on the accurate progression of this process, alterations at this

level can affect the normal nuclear architecture and induce vulnerability to oxidative stress and to DNA fragmentation [25, 26]. A few studies have been reported about SDF in carriers of a chromosomal abnormality [7, 27] and abnormal SDF values have been found in these patients. Perhaps the biological process may be similar because chromosomal reorganization could interfere with the normal nuclear architecture.

The implication of all of these data could be useful for clinical practice. In particular, it would be interesting to know to what extent which of the disturbances described here, albeit less marked, could be present in other men with heterochromatin polymorphism. The correlation seen between sperm DNA integrity and the presence of heterochromatin polymorphism, if confirmed, can be of help, in order to establish a predictive fertility status, simply by an SDF analysis in this type of carrier.

Further studies focusing on the role of chromosome-9 heterochromatin during male gametogenesis will be needed in order to elucidate the mechanisms underlying meiotic failure observed in carriers of chromosome-9 polymorphic variants.

Acknowledgments

The authors wish to thank Raquel Torres for technical assistance and Chuck Simmons for the English revision of this manuscript. This work was supported by the Fondo Investigación Sanitaria (Grant Numbers PI051834, PI080623 to J. Benet), and by the Generalitat de Catalunya (Grant Number 2009 SGR 1107 to J. Benet). A. García-Peiró has a grant from the Càtedra de Recerca Eugin-UAB.

References

- [1] P. F. Madon, A. S. Athalye, and F. R. Parikh, "Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 11, no. 6, pp. 726–732, 2005.
- [2] K. Yakin, B. Balaban, and B. Urman, "Is there a possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis?" *International Journal of Urology*, vol. 12, no. 11, pp. 984–989, 2005.
- [3] J. Lissitsina, R. Mikelsaar, and M. Punab, "Cytogenetic analyses in infertile men," *Archives of Andrology*, vol. 52, no. 2, pp. 91–95, 2006.
- [4] M. Codina-Pascual, J. Navarro, M. Oliver-Bonet et al., "Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes," *Human Reproduction*, vol. 21, no. 6, pp. 1490–1497, 2006.
- [5] M. Benchaib, V. Braun, J. Lornage et al., "Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique," *Human Reproduction*, vol. 18, no. 5, pp. 1023–1028, 2003.
- [6] M. Bungum, P. Humaidan, A. Axmon et al., "Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome," *Human Reproduction*, vol. 22, no. 1, pp. 174–179, 2007.
- [7] A. Perrin, E. Caer, M. Oliver-Bonet et al., "DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality," *Fertility and Sterility*, vol. 92, no. 2, pp. 583–589, 2009.
- [8] A. García-Peiró, J. Martínez-Heredia, M. Oliver-Bonet et al., "Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm," *Fertility and Sterility*. In press.
- [9] World Health Organization, *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 4th edition, 1999.
- [10] M. Codina-Pascual, M. Oliver-Bonet, J. Navarro et al., "Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator," *Human Reproduction*, vol. 20, no. 8, pp. 2133–2139, 2005.
- [11] A. H. F. M. Peters, A. W. Plug, M. J. Van Vugt, and P. De Boer, "A drying-down technique for the spreading of mammalian melocytes from the male and female germline," *Chromosome Research*, vol. 5, no. 1, pp. 66–68, 1997.
- [12] D. Domínguez-Fandos, M. I. Camejo, J. L. Ballescà, and R. Oliva, "Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy," *Cytometry A*, vol. 71, no. 12, pp. 1011–1018, 2007.
- [13] J. L. Fernández, L. Muriel, V. Goyanes et al., "Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation," *Fertility and Sterility*, vol. 84, no. 4, p. 860, 2005.
- [14] F. Vidal, M. Moragas, V. Catala et al., "Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study," *Human Reproduction*, vol. 8, no. 10, pp. 1740–1743, 1993.
- [15] A. L. Barlow and M. A. Hultén, "Crossing over analysis at pachytene in man," *European Journal of Human Genetics*, vol. 6, no. 4, pp. 350–358, 1998.
- [16] J. H. M. Lammers, H. H. Offenbergh, M. Van Aalderen, A. C. G. Vink, A. J. J. Dietrich, and C. Heyting, "The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 14, no. 2, pp. 1137–1146, 1994.
- [17] R. L. J. Meuwissen, H. H. Offenbergh, A. J. J. Dietrich, A. Riesewijk, M. Van Iersel, and C. Heyting, "A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes," *EMBO Journal*, vol. 11, no. 13, pp. 5091–5100, 1992.
- [18] J. Navarro, C. Templado, J. Benet, R. Lange, O. Rajmil, and J. Egozcu e, "Sperm chromosome studies in an infertile man with partial, complete asynapsis of meiotic bivalents," *Human Reproduction*, vol. 5, no. 2, pp. 227–229, 1990.
- [19] F. Sun, P. Turek, C. Greene, E. Ko, A. Rademaker, and R. H. Martin, "Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia," *Fertility and Sterility*, vol. 87, no. 3, pp. 565–571, 2007.
- [20] A. J. Solari, R. Ponzio, and G. Rey Valzacchi, "Synaptonemal complex karyotyping in an oligospermic patient with heterochromatin duplication in chromosome n. 9," *Medicina*, vol. 51, no. 3, pp. 217–221, 1991.
- [21] R. H. Martin, "Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 16, no. 4, pp. 523–531, 2008.
- [22] F. Sun, M. Mikhaail-Philips, M. Oliver-Bonet et al., "Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy

- in men with non-obstructive azoospermia,” *Molecular Human Reproduction*, vol. 14, no. 7, pp. 399–404, 2008.
- [23] D. Sakkas, E. Seli, D. Bizzaro, N. Tarozzi, and G. C. Manicardi, “Abnormal spermatozoa in the ejaculated: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis,” *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 7, no. 4, pp. 428–432, 2003.
- [24] G. N. De Iulii, L. K. Thomson, L. A. Mitchell et al., “DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress,” *Biology of Reproduction*, vol. 81, no. 3, pp. 517–524, 2009.
- [25] R. J. Aitken and G. N. De Iulii, “Origins and consequences of DNA damage in male germ cells,” *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 14, no. 6, pp. 727–733, 2007.
- [26] N. Torregrosa, D. Domínguez-Fandos, M. I. Camejo et al., “Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients,” *Human Reproduction*, vol. 21, no. 8, pp. 2084–2089, 2006.
- [27] F. Brugnon, E. Van Assche, G. Verheyen et al., “Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients,” *Human Reproduction*, vol. 21, no. 3, pp. 685–693, 2006.

4.3. ARTÍCULO 3

Título: Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes.

Autores: Agustín García-Peiró, María Oliver-Bonet, Joaquina Navarro, Carlos Abad, Miriam Guitart, María José Amengual, Jaime Gosálvez and Jordi Benet

Publicación: International Journal Andrology. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01153.x.

ORIGINAL ARTICLE

Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes

A. García-Peiró,*† M. Oliver-Bonet,*‡ J. Navarro,* C. Abad,§ M. Guitart,¶ M. J. Amengual,¶ J. Gosálvez** and J. Benet*

*Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Bellaterra, †Càtedra de Recerca Eugén-UAB, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ‡Unitat d'Investigació Hospital Universitari Son Dureta, Palma de Mallorca, §Servei d'Urologia, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, ¶UDIAT, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, and **Departamento de Biología, Unidad de Genética, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Summary

Keywords:

cytogenetics, DNA damage, infertility, meiosis, semen analysis, spermatogenesis

Correspondence:

J. Benet and A. García-Peiró, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona; Bellaterra 08193, Spain. E-mail: jordi.benet@uab.es and agusti.garcia@uab.es

Received 16 July 2010; revised 25 January 2011; accepted 1 February 2011

doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01153.x

This investigation was conducted to assess the baseline level of sperm DNA fragmentation (SDF) in a cohort of patients presenting chromosomal rearrangements (nine reciprocal translocations and two inversions). In a separate experiment, a dynamic analysis to calculate the rate of SDF (rSDF), after a varying period of sperm storage (0 h, 1 h, 4 h, 8 h and 24 h) at 37 °C, was performed. Results were compared with eight fertile donors. Different experimental approaches to assess SDF, such as terminal transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL), sperm chromatin structure assay (SCSA) and sperm chromatin dispersion test (SCDt), were used. No differences for the baseline level of SDF were found. Carriers of reorganized genomes showed statistically higher levels of SDF than did control donors ($p = 0.025$ for TUNEL; $p = 0.022$ for SCSA; $p = 0.014$ for SCDt). However, 54.5% (6/11) of the patients presented values similar to those of control donors. There was no significant difference in rSDF ($p = 0.34$). Nevertheless, the results suggest that a high variability for SDF and rSDF exists in these patients. Routine analysis of SDF and rSDF should be considered in patients presenting rearranged genomes to determine fertility status for assisted reproductive techniques (ART) purposes.

Introduction

Infertility is a problem that affects 15% of all couples in the reproductive age (de Kretser, 1997). Male factors account for 30–50% of cases (Campbell & Irvine, 2000); thus, analysing the involved factors and effectors of such an impossibility to achieve pregnancy is a matter of increasing interest. It is well-known that male carriers of chromosomal rearrangements have an increased risk of having reproductive failures (McLachlan *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 2009). Chromosomal rearrangements may exist in a homozygous and/or heterozygous state with the main difference that when heterozygous, chromosome pairing tends to produce unusual bivalent or multivalent configurations with a quality-deprived meiotic division, which increases the amount of unbalanced haploid nuclei at the end of anaphase II. Homozygosity for unbalanced

chromosomal rearrangements is less common. The main known reason for the low fertility and implantation rates in carriers of chromosomal rearranged genomes is the production of chromosomally unbalanced gametes during meiosis (Egozcue *et al.*, 2000; Shi & Martin, 2001). However, other causes might interfere in the fertility of these patients. Among them, particular interest has been paid during the last few years to the quality of the DNA molecule in the spermatozoa, which has been associated with infertility in patients with a normal karyotype (Zini & Sigman, 2009). Sperm DNA fragmentation (SDF) is the result of a complex compendium of stressors acting on the DNA molecule (Aitken & De Iuliis, 2010). The final result is DNA breakage in a highly packed double stranded helix through an apoptotic or apoptotic-like process (Sakkas *et al.*, 2004; Brugnol *et al.*, 2010). In addition, a series of not well-defined processes during

sperm maturation, such as excessive production of reactive oxygen species (ROS) (Agarwal *et al.*, 2008; Makker *et al.*, 2009) or loss in sperm capacity to replace histones with protamines during spermiogenesis (Carrell *et al.*, 2007, 2008), might generate single- or double-strand DNA damage, which could be detected in ejaculated sperm samples (Enciso *et al.*, 2009).

Few recent reports have been published on DNA integrity in carriers of structural chromosomal rearrangements (Brugnon *et al.*, 2006, 2010; Perrin *et al.*, 2009). These works have shown SDF values, which are significantly higher in ejaculated spermatozoa of chromosomal abnormality carriers than in genetically stable genomes. This effect seems to be closely linked to the presence of the chromosome's abnormality, as unbalanced spermatozoa tend to present a fragmented DNA molecule (Muriel *et al.*, 2007). Therefore, DNA fragmentation could be an additional explanation for the infertility observed in individuals affected by chromosomal rearrangements. However, not all carriers are infertile and, of course, it is not clear how chromosomal reorganizations can affect DNA integrity, thus contributing to developing infertility.

The aim of this investigation was to analyse a series of individuals characterized as carriers of different chromosomal rearrangements to assess the relationship between unbalanced genomes and the incidence of spermatozoa with DNA damage. To this end, a multiple comparison using different technologies was used to assess SDF on a cohort of control and on individuals presenting an abnormal karyotype. In addition, advantage was taken of some of the different methodologies used to investigate aspects of the dynamics of sperm DNA fragmentation (rSDF) to go further beyond the simplistic description of the baseline level of DNA damage among these cohorts of sperm samples.

Materials and methods

Donor and sample preparation

Semen samples from 19 individuals (eight control donors of proven fertility and 11 carriers of chromosomal structural abnormalities) were obtained by masturbation after 3 days of sexual abstinence. Fresh ejaculate was allowed to liquefy and was then cryopreserved. Written, informed consent was given by all patients, and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

The karyotype, age and spermogram of patients (nine reciprocal translocation carriers and two inversion carriers) included in the analysis are summarized in Table 1. For the DNA integrity assessment, all samples were thawed by immersion in a 37 °C water bath for 30 sec, washed three times with PBS at room temperature and diluted to 15–20 × 10⁶ spermatozoa/mL.

Table 1 Karyotype, age and spermogram available for patient carriers of chromosomal structural abnormality

Patient	Karyotype	Age	Spermogram
PR 1	Inv(1)(p22q34.3)	–	–
PR 2	Inv(7)(p13q36)	38	Normal
PR 3	t(9;17)(q12;p12)	–	–
PR 4	t(4;8)(q28;p23)	31	Normal
PR 5	t(1;13)(q41;q22)	36	Normal
PR 6	t(3;19)(p21;p13.3)	43	Normal
PR 7	t(11;17)(q13.1;p11.2)	31	Teratospermia
PR 8	t(10;14)(q24;q32)	25	Normal
PR 9	t(3;8)(q26.2;p21.1)	–	–
PR 10	t(12;16)(q24.1;p11)	–	–
PR 11	t(2;13)(q21;q32)	–	–

Assessment of sperm DNA fragmentation dynamics

The samples were incubated at 37 °C in PBS. The SDF, the ratio of fragmented vs. total spermatozoa in the analysed sample, expressed as a percentage, was assessed after 0 h, 1 h, 4 h, 8 h and 24 h of incubation (t₀, t₁, t₄, t₈ and t₂₄). This time-period was selected to show the differences in sperm DNA damage within a reasonable time in which the spermatozoa might be viable for ART. The samples were assessed for SDF immediately after they had been thawed (t₀), and the corresponding SDF was considered as the baseline for this particular donor. The Halosperm Kit (Halotech DNA SL; Madrid, Spain) was used to determine SDF following commercial instructions. Slides were stained for fluorescence microscopy using propidium iodide (2.5 µg/mL in Vectashield; Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). For this study, 200 spermatozoa were scored per experimental point. Characteristic phenotypes of sperm chromatin dispersion corresponding to the non-fragmented, fragmented and degraded sperm DNA are shown in Fig. 1.

TUNEL assay

For terminal transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL), the in Situ Cell Death Detection Kit from Roche (Ref.11684795910; Roche Diagnostic GmbH, Penzberg, Germany) was used as previously described (Barroso *et al.*, 2000; Domínguez-Fandós *et al.*, 2007). This assay quantifies the incorporation of labelled deoxyuridine triphosphate (dUTP) using flow cytometry or fluorescent microscopy at the sites of DNA breaks in a reaction catalysed by the deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme. The negative control was incubated without the TdT enzyme, and the positive control was also prepared using an additional treatment with DNase I (Roche Diagnostic

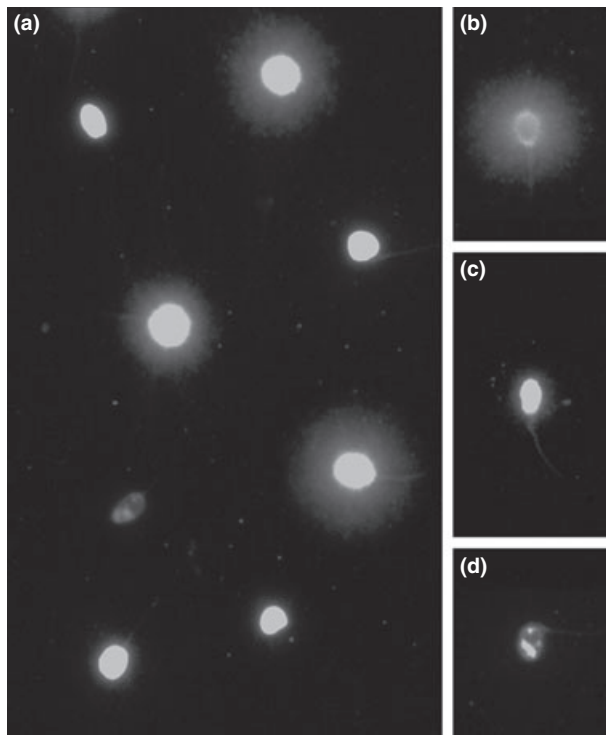


Figure 1 Sperm DNA fragmentation determined using the sperm chromatin dispersion (SCD) test. Staining with propidium iodide shows different types of haloes of sperm DNA. (a) Sample from a subject of the study. (b–d) Sperm cell without DNA fragmentation shows a big halo. Sperm cell with fragmented DNA, this without a halo, and degraded sperm, another type of DNA-fragmented sperm.

GmbH), 100 IU for 10 min at 37 °C, before the labelling reaction.

For flow cytometry analysis, each sperm sample was transferred to a final volume of 1 mL in PBS. Green fluorescence (TUNEL-positive cells) was measured using a 530 ± 30 nm band-pass filter. A total of 10 000 sperm were analyzed for each sample at a flow rate of 200–300 sperm/sec on a flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, NJ, USA). Data were processed using CELLQUEST analysis software (Becton Dickinson) after gating out cell debris.

Sperm chromatin structure assay (SCSA)

The SCSA protocol has been described elsewhere by Evenson *et al.* (1999). Briefly, an aliquot of the thawed semen sample was diluted to a concentration of 2×10^6 spermatozoa/mL in TNE buffer (0.01 M Tris, 0.15 M NaCl, and 1 mM EDTA, pH 7.4) to a total volume of 200 µL. Thereafter, 400 µL of acid detergent solution (0.08 M HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 1.2) was added. After 30 sec, the spermatozoa were stained by adding acridine orange (AO) staining solution containing 6 µg AO (Invitrogen; Molecular Probes; Eugene, OR, USA) per mL buffer (0.037 M citric acid, 0.126 M Na₂HPO₄, 1.1 mM EDTA disodium, 0.15 M NaCl, pH 6.0). After 3 min of staining, a total of 5000 sperm cells were analysed using flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson). The percentage of spermatozoa with DNA fragmentation was determined between the main sperm population, which has a normal level of red fluorescence (normal DNA integrity), and those with increased red fluorescence, corresponding to fragmented DNA.

Statistical analysis

Data analysis was performed using the SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) program. Values were compared using the Mann–Whitney *U*-test. The Kruskal–Wallis test was applied to determine statistical differences among the intertechnique estimation of DNA damage. Correlations were studied by the Pearson test. The level of significance was established at 95% of confidence interval (CI) to be considered statistically significant.

Results

Multiple DNA fragmentation assessment

Data pertaining to SDF (t0) analysis are also given in Table 2. For TUNEL, SCSA and sperm chromatin dispersion test (SCDt), values were higher in spermatozoa from carriers of structurally reorganized chromosomes (24.18 ± 9.88 , range: 9–44; 24.36 ± 10.80 , range: 9–40;

Table 2 Comparison of sperm DNA fragmentation (SDF) in carriers of structurally rearranged chromosomes and fertile donors

	TUNEL	SCSA	SCD	<i>p</i> -value
Patients (<i>n</i> = 11)	24.18 ± 9.88	24.36 ± 10.80	24.81 ± 12.60	0.997
Donors (<i>n</i> = 8)	15.12 ± 3.52	13.75 ± 5.80	13.12 ± 4.42	0.689
<i>p</i> -value	0.025*	0.022*	0.014*	

Values are mean ± SD.

SCD, sperm chromatin dispersion; SCSA, sperm chromatin structure assay; TUNEL, terminal transferase dUTP nick-end labelling.

*Statistical differences (*p* < 0.05).

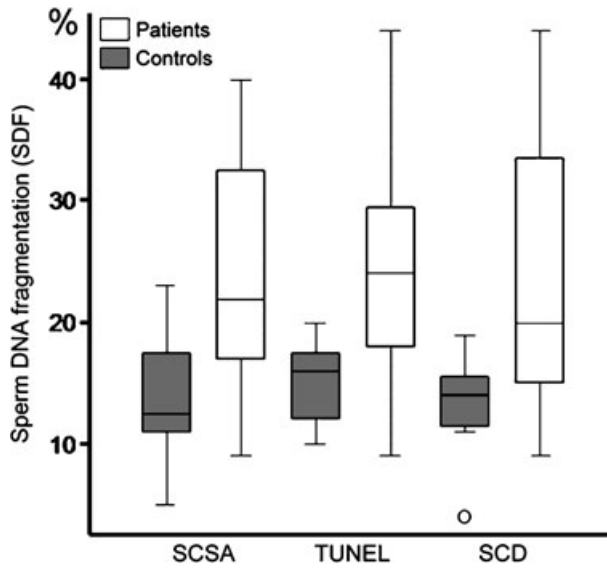


Figure 2 Box-and-whisker plots for the sperm DNA fragmentation (SDF) observed in a cohort of semen samples from fertile donors and patients carrying some type of rearranged genomes. Flow cytometric terminal transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay, sperm chromatin structure assay (SCSA) and sperm chromatin dispersion (SCD) tests were applied. Statistical differences were obtained for all methods between groups of patients and donors. No differences among the methods were observed (See Table 2).

24.81 ± 12.60, range: 9–43, respectively) than those exhibited by spermatozoa from the control group (15.12 ± 3.52, range: 10–20; 13.75 ± 5.80, range: 5–23; 13.12 ± 4.42, range: 4–19, respectively) (Fig. 2). Differences were statistically significant ($p = 0.025$ for TUNEL; $p = 0.022$ for SCSA; $p = 0.014$ for SCDt). The three methods were compared using the Kruskal–Wallis test and no differences among the estimation of DNA damage were found ($p > 0.05$), and dispersion graph representation and correlation values among the three methodologies are represented in Fig. 3. All comparisons showed r values of over 0.75, which is indicative of a high correlation.

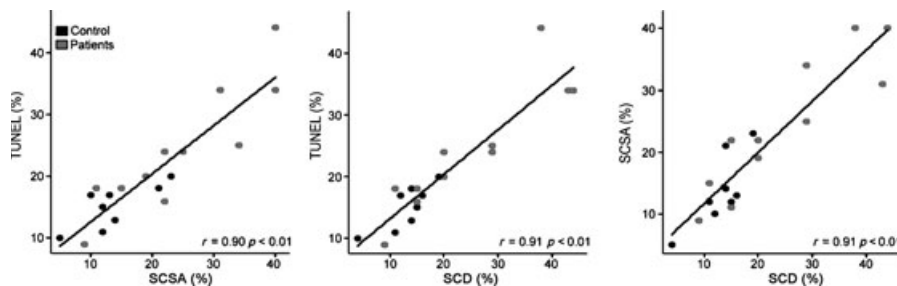


Figure 3 Correlation between the different methodologies to assess sperm DNA fragmentation in all samples of the study.

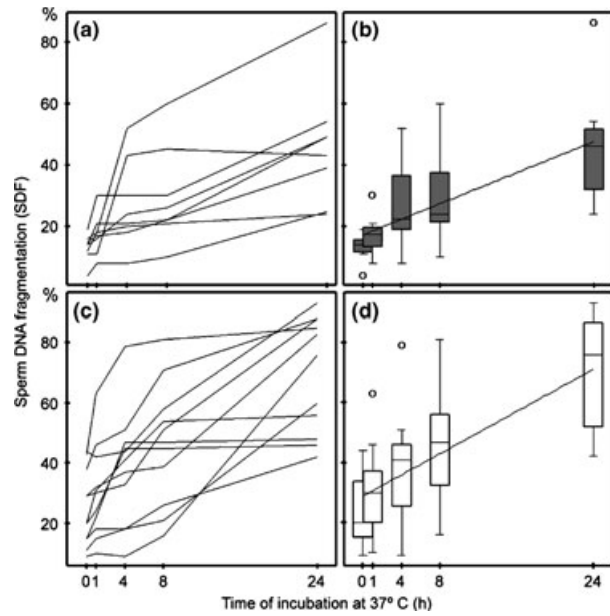


Figure 4 Line representation and box-and-whisker plots for the sperm DNA fragmentation observed at different incubations time (0 h, 1 h, 4 h, 8 h and 24 h) at 37 °C for control donors (a, b) and patients with structurally rearranged genomes (c, d).

Dynamics of sperm DNA fragmentation by SCDt

A representation plot showing SDF observed at different incubation times is displayed in Fig. 4. For all samples, results showed a progressive increase in SDF, with respect to the baseline level of SDF observed at time t0, which was different for all individuals. Moreover, with independence of the differences in the basal level of SDF, during the t0–t8 incubation time lapse, the rSDF obtained for the carrier group was 2.68 ± 1.34 (range: 0.75–4), and for the fertile control group was 2.04 ± 1.79 (range: 0.5–1.37), but no statistical differences were found between patients with a rearranged genome vs. control group ($p = 0.34$; Mann–Whitney U -test). However, at 24 h of incubation, SDF (t24) was significantly higher ($p = 0.01$)

in spermatozoa from patients (69.54 ± 19.35 , range: 42–93) than in spermatozoa from the control group (46.12 ± 19.51 , range: 24–86).

Discussion

There are three main objectives of this work: (i) to compare the data for SDF as assessed using different methodologies, (ii) to gain information about SDF in individuals who are reported as being carriers of a reorganized genome when compared with donor samples, and (iii) to characterize the dynamics of SDF in these two cohorts when the spermatozoa are incubated under physiological conditions of temperature.

Although from some previous studies it is evident that frozen-thawed semen samples may activate an apoptotic-like process and DNA fragmentation, this effect seems to be moderately uniform (Brugnon *et al.*, 2006; De Paula *et al.*, 2006). Nevertheless, for practical reasons, we use cryopreserved semen samples and, as a consequence, we believe, we are compelled to use multiple methodologies to optimize the work. There is a cryptic debate on which technique is the most reliable to assess sperm DNA damage (Erenpreiss *et al.*, 2004; Chohan *et al.*, 2006). In the present work, the SDF analysed with TUNEL, SCSA and SCDt in donors and carriers of structural aberrations showed a significant increase in the DNA damage level at baseline time, whereas inter-technique differences were not found (Table 2). According to the results obtained, our work agrees with a previous report by Chohan *et al.* (2006), where all three methodologies displayed a high correlation amongst themselves. However, we wish to point out that individual results are not identical, especially concerning the samples with worse DNA integrity, which showed more variable results (Fig. 3). This observation could be linked to the technical aspects of each methodology used in this study.

The TUNEL assay detects both single- and double-strand DNA breaks by enzymatic reaction and can be analysed microscopically or using flow cytometry. Recent efforts to standardize this method have been performed as recent papers have reported that variation in different steps in the process of the TUNEL assay can affect the SDF measurement (Domínguez-Fandós *et al.*, 2007; Muratori *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2011). Concerning this, a special interest has been taken regarding the presence of M540 apoptotic bodies. These structures represent a confounding factor in studies on ejaculated spermatozoa because of the inability of Flow cytometer to distinguish sperm cells, which exhibit similar forward Scatter/Side Scatter properties (Marchiani *et al.*, 2007). Although the presence of apoptotic bodies has not been demonstrated in patients with reorganized genomes, Marchiani *et al.*

(2007), in a previous characterization of these structures, showed that they are more or less present in all individuals analysed. They found a much higher content of M540 bodies in oligoasthenoteratozoospermic and asthenoteratozoospermic subjects when comparing them with normozoospermic ones. On the contrary, asthenozoospermic and teratozoospermic men had the same levels as normozoospermic subjects had (Marchiani *et al.*, 2007). In our study, the confounding effect that apoptotic bodies may cause was not taken into account. As a consequence, the correlation obtained could be conditioned by these structures. However, as SCDt is a microscopic method that clearly distinguishes between spermatozoa and other structures, the possibility of confusion is ruled out. Based on the results obtained, the presence of apoptotic bodies could be unrepresentative in these individuals.

In its turn, the SCSA is a widespread test used in human semen samples (Evenson *et al.*, 1999). SCSA measures the differential bindability of AO to sperm DNA that has been differentially denatured according to the level of DNA damage. Recently, it has been suggested that the TUNEL and SCSA methods could measure different aspects of gamete quality (Henkel *et al.*, 2010). Finally, the SCDt is an experimental approach based on the capacity of the chromatin to exhibit different haloes of chromatin dispersion according to the level of DNA damage present in the spermatozoa when the sperm sample is processed to produce a controlled DNA denaturation and protein depletion (Fernández *et al.*, 2003, 2005). This methodology allows for an indirect visualization of the DNA damage harboured in the spermatozoa, but provides the possibility of assessing sperm DNA damage ad hoc.

The second item we wish to highlight is that semen samples from carriers of such genome reorganization exhibit statistically increased rates of DNA damage. Using the TUNEL assay, a few earlier studies have evaluated the DNA fragmentation rate in ejaculated spermatozoa of patients carrying a chromosomal reorganization with similar results (Brugnon *et al.*, 2006, 2010; Perrin *et al.*, 2009). In each of these works, the rates of SDF were significantly higher in the whole group of carriers of a chromosomal structural abnormality. Specifically, Perrin *et al.* (2009) concluded that the DNA fragmentation rate depends solely on the presence of a chromosomal structural abnormality and therefore a chromosomal structural abnormality predicts DNA fragmentation. In some respects, we agree with this observation. However, the standard deviation values obtained for SDF are indicative of significant heterogeneity existing in this group. In fact, we found that 54.5% (6/11) of the samples analysed from carriers of chromosomal reorganization presented SDF values at t0 similar to those of the control group. Comparable values can be calculated from the results of Perrin

et al. (2009), where 40% (15/37) of the samples presented similar values regarding their own control group. On the whole, these results are indicative that patients with chromosomal rearrangements tend to have increased rates of SDF, but we would like to point out that a representative subpopulation of these patients displays similar rates of SDF as do fertile donors. Therefore, not all carriers of genome rearrangements necessarily involve poor basal sperm DNA integrity, but other aspects related to SDF could be present in the aetiology of these patients. This observation could be highlighted based on some aspects of the study of dynamics of sperm DNA damage.

Different SDF dynamics among individuals can be observed when semen samples are incubated at 37 °C. This indicates that some individuals may present a more intense rate of sperm DNA damage than others may and, conversely, some sperm samples are more resistant to DNA fragmentation than are others (Gosálvez *et al.*, 2009; García-Peiró *et al.*, in press). In the present work, a different and progressive increase of DNA damage for each sample with respect to the baseline level of SDF observed at time t_0 is shown. Basal values ranged from 4% to 19% SDF for the control group and from 9% to 44% for the carrier group; after t_4 – t_8 h of incubation, 37% of the samples from the control group exceeded the critical level of 30% of spermatozoa with DNA damage (Evenson & Wixon, 2008), whereas 72% of the carriers exceeded the same value. Moreover, independently of the differences in the basal level of SDF, during the incubation time lapse t_0 – t_8 , the rSDF obtained in the control individuals was, on average, of the order of 2.04% per hour, whereas in the carriers group, the rSDF was 2.68% per hour. No significant differences were found between the longevity of the sperm DNA ($p = 0.34$; Mann–Whitney U -test), but the rSDF produced such increasing values of SDF that, after 24 h, only two samples in the control group could be considered as exhibiting a certain level of spermatozoa containing DNA fragmentation below 30%, whereas at the same period of incubation, all carrier samples had values of SDF higher than 30% (Fig. 4). In addition, statistical differences for SDF(t_{24}) between both groups were found ($p = 0.01$). A direct interpretation of this comparison suggests that sperm DNA from carriers of rearranged genomes could be more vulnerable, whereas sperm DNA from fertile donors tends to present better for DNA integrity. In any case, the results show that, in both cohorts, individuals with high or low sperm DNA longevity could be discriminated. This result is congruent with the dynamic behaviour observed for other species such as human (Gosálvez *et al.*, 2009), ram (López-Fernández *et al.*, 2007), stallion (López-Fernández *et al.*, 2008) or even distant species in the evolutionary tree such as fish (López-Fernández *et al.*, 2009).

Accordingly, all these observations could be related to the complex organization of DNA in the sperm cell nucleus. Fluorescence in situ hybridization with arm-specific DNA probes for chromosomes 1, 2 and 5 has been used to visualize genome domains that are congruent with a hierarchical level of the sperm chromatin structure, supporting the existence of a well-defined nuclear architecture in human sperm nuclei (Foster *et al.*, 2005; Mudrak *et al.*, 2005). In addition, other chromosome domains, such as those related to alkali labile sites, exhibit stable regionalization and mapping with variations among species, but are highly conserved intraspecifically (McPherson & Longo, 1992; Marcon & Boissonneault, 2004; Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2008). In this scenario of highly complex nuclear organization, the presence of chromosomal reorganization could hinder the normal nuclear DNA compaction process during spermiogenesis. In fact, using electron microscopy, a high percentage of spermatozoa with defects, especially in spermiogenesis, has been seen in Robertsonian translocation carriers (Brugnon *et al.*, 2010). All these observations, in addition to the data reported in this study, especially regarding the high variability observed in the SDF(t_0), suggest that sperm DNA integrity in these patients may depend on each specific type of chromosomal reorganization. Therefore, some patients may be more prone to having better sperm DNA integrity, similar to fertile donors, than others. The potential fertility status of patients carrying a chromosomal abnormality could be linked to these aspects.

Conclusions

In conclusion, data show a good correlation among SCSA, TUNEL and SCDt in both semen samples of fertile men and structurally rearranged chromosomes. The great degree of variability of DNA fragmentation that exists for carriers would be suggestive that different reorganizations would interfere specifically with the spermatozoa's nuclear architecture, increasing susceptibility to DNA damage. Finally, SDF and rSDF can provide valuable information about fertility status and reproductive counsel in male carriers of rearranged genomes.

Acknowledgements

We thank Raquel Torres for her technical assistance and Chuck Simmons for the English language revision of this manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no financial or personal conflicts of interest that might affect any aspect of this study.

Financial support

This study was supported by the Fondo Investigación Sanitaria (Madrid) (Project PI08/0623), by the Generalitat de Catalunya (project 2009 SGR 1107) and by the Càtedra de Recerca Eugén-UAB.

References

- Agarwal A, Makker K & Sharma R. (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 59, 2–11.
- Aitken RJ & De Iulius GN. (2010) On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 16, 3–13.
- Barroso G, Morshedi M & Oehninger S. (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15, 1338–1344.
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I & Van Steirteghem A. (2006) Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 21, 685–693.
- Brugnon F, Janny L, Communal Y, Darcha C, Szczepaniak C, Pellestor F, Vago P, Pons-Rejraji H, Artonne C & Grizard G. (2010) Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carrier patients. *Hum Reprod* 25, 1631–1642.
- Campbell AJ & Irvine DS. (2000) Male infertility and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Br Med Bull* 56, 616–629.
- Carrell DT, Emery BR & Hammoud S. (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 13, 313–327.
- Carrell DT, Emery BR & Hammoud S. (2008) The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *Int J Androl* 31, 537–545.
- Chohan KR, Griffin JT, LaFromboise M, De Jonge CJ & Carrell DT. (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 27, 53–59.
- Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL & Gosálvez J. (2008) Alkali-labile sites in sperm cells from *Sus* and *Ovis* species. *Int J Androl* 31, 354–363.
- De Paula TS, Bertolla RP, Cunha MA, Schor N & Cedenho AP. (2006) Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril* 86, 597–600. PMID:16952507.
- Domínguez-Fandós D, Camejo MI, Balleca JL & Oliva R. (2007) Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry Part A* 71, 1011–1018.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F & Egozcue J. (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6, 93–105.
- Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL & Gosálvez J. (2009) A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 18, 609–616.
- Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreiss J & Spano M. (2004) Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod* 19, 2277–2282.
- Evenson DP & Wixon R. (2008) Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril* 90, 1229–1231.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P & Claussen OP. (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14, 1039–1049.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R & Alvarez JG. (2003) The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24, 59–66.
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M & De Jonge C. (2005) Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 84, 860.
- Foster HA, Abeydeera LR, Griffin DK & Bridger JM. (2005) Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *J Cell Sci* 118, 1811–1820.
- García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Jones C, Coward K, Gosálvez J & Benet J. (2010) Protamine P1/P2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril* 95, 105–109.
- Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P & Nuñez R. (2009) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril* 92, 170–173.
- Henkel R, Hoogendijk CF, Bouic PJ & Kruger TF. (2010) TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. *Andrologia* 42, 305–313.
- de Kretser DM. (1997) Male infertility. *Lancet* 349, 787–790, Review.
- López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD & Gosálvez J. (2007) Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 68, 1240–1250.
- López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez A, Arroyo F, Vázquez JM, Holt WV & Gosálvez J. (2008) Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. Ram. *Theriogenology* 70, 898–908.
- López-Fernández C, Gage MJ, Arroyo F, Gosálvez A, Larrán AM, Fernández JL & Gosálvez J. (2009) Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (*Tinca tinca*: Teleostei, Cyprinidae) measured using a sperm chromatin dispersion test. *Reproduction* 138, 257–266.
- Makker K, Agarwal A & Sharma R. (2009) Oxidative stress & male infertility. *Indian Med Res* 129, 357–367.
- Marchiani S, Tamburrino L, Maoggi A, Vannelli GB, Forti G, Baldi E & Matorini M. (2007) Characterization of M540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies. *Mol Hum Reprod* 13, 621–631.
- Marcon L & Boissonneault G. (2004) Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 70, 910–918.
- McLachlan RI, Mallidis C, Ma K, Bhasin S & de Kretser DM. (1998) Genetic disorders and spermatogenesis. *Reproduction Fertility Device* 10, 97–104.
- McPherson SM & Longo FJ. (1992) Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev* 31, 268–279.
- Mitchell LA, De Iulius GN & Aitken RJ. (2011) The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is

- influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int J Androl* 34, 2–13.
- Moretti E, Pascarelli NA, Giannerini V, Geminiani M, Anichini C & Collodel G. (2009) 18, X, Y aneuploidies and transmission electron microscopy studies in spermatozoa from five carriers of different reciprocal translocations. *Asian J Androl* 11, 325–332.
- Mudrak O, Tomilin N & Zalensky A. (2005) Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *J Cell Sci* 118, 4541–4550.
- Muratori M, Forti G & Baldi E. (2008) Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling. *Cytometry Part A* 73, 785–787.
- Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Alvarez JG & Fernández JL. (2007) Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl* 28, 38–49.
- Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, De Braekeleer M & Morel F. (2009) DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril* 92, 583–589.
- Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W & Bizzaro D. (2004) The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Hum Fertil* 7, 99–103.
- Shi Q & Martin RH. (2001) Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 121, 655–666.
- Zini A & Sigman M. (2009) Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 30, 219–229.

4.4. ARTÍCULO 4

Título: Differential Clustering of Sperm Subpopulations in Infertile Males with Clinical Varicocele and Carriers of Rearranged Genomes.

Autores: Agustín García-Peiró, María Oliver-Bonet, Joaquina Navarro, Carlos Abad, María José Amengual, Carmen López-Fernández, Jaime Gosálvez and Jordi Benet

Publicación: Journal of Andrology. 2011, Aug 11.

Differential Clustering of Sperm Subpopulations in Infertile Males With Clinical Varicocele and Carriers of Rearranged Genomes

AGUSTÍN GARCÍA-PEIRÓ,*† MARÍA OLIVER-BONET,* JOAQUIMA NAVARRO,* CARLOS ABAD,‡
MARÍA JOSÉ AMENGUAL,§ CARMEN LÓPEZ-FERNÁNDEZ,|| JAIME GOSÁLVEZ,|| AND
JORDI BENET*

From the *Càtedra de Recerca Eugin and the †Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; the ‡Servei d'Urologia; the §UDIAT, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Spain; and the ||Departamento de Biología, Unidad de Genética, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

1
2

ABSTRACT: Some methods for determining sperm DNA fragmentation, such as the sperm chromatin structure assay (SCSA) and the sperm chromatin dispersion test (SCD), provide additional information about particular subgroups of spermatozoa with specific irregularities. Thus, SCSA recognizes a specific sperm subpopulation, the high-DNA stainability sperm subpopulation (HDS), and SCD recognizes the so-called DNA-degraded sperm (DDS) subpopulation. Although some studies associate the presence of these subpopulations with specific aspects related to infertility, the relationship between both sperm subpopulations and their preponderance in specific clinical groups of infertile males has not been extensively investigated. In this study, HDS and DDS subpopulations were determined in a total of 37 human males: 8 males with proven fertility, 9 infertile males with asthenoteratozoospermia, 10 carriers of chromosomal reorganizations, and 10 infertile males with clinical varicocele. Results showed a significant

increase of the DDS subpopulation ($P < .001$) in both the varicocele patient (16.85 ± 7.24) and carrier of rearranged genome (11.6 ± 5.23) groups, but not in patients with asthenoteratozoospermia (3.88 ± 1.55) or fertile donors (2.62 ± 1.68). No statistical differences were detected for the HDS subpopulation ($P = .542$), but the highest values were found in the varicocele and rearranged-genome groups. However, no correlation between the HDS and DDS subpopulations were found ($r = 0.196$; $P = .244$), suggesting that both represent a different class of sperm subpopulation in the ejaculate. A significant increase in HDS, and especially DDS, can be associated with the presence of varicocele or the rearrangement of chromosomes. Specific diagnostic tests to confirm the diagnosis must be performed in patients with increased DDS and HDS values.

Key words: Human spermatozoa, infertility, DNA damage.

J Androl 2012;33:000-000

Ejaculated sperm does not contain a homogeneous sperm population, but is rather a compendium of different subpopulations where variations in the level of maturity, morphoanomalies, sperm motility, DNA integrity, and some other characteristics may be assumed as being a normal condition of a sperm sample (Thurston et al, 2001; Buffone et al, 2004). However, the preponderance of some of these subpopulations in the ejaculate may be associated with certain pathologies and could compete for fertilization with the normal sperm, or they may have sublethal or even lethal effects on embryo development after fertilization (Enciso et al,

2006; Lin et al, 2007). The identification of such subpopulations is not an easy task, because the pattern of variation among individuals is quite large, and is even larger when different sperm pathologies are compared. In the particular case of sperm-chromatin damage assessment, sperm containing a nonorthodox DNA chromatin configuration does not escape this scenario. For example, after performing the sperm chromatin structure assay (SCSA), a typical sperm subpopulation identified as presenting an abnormally high DNA stainability (HDS) is found. This subpopulation seems to be related to the presence of a variable level of immature sperm (Zini et al, 2008). Additionally, two other populations, one containing a DNA molecule highly susceptible to DNA denaturation and interpreted as a damaged DNA molecule, and a second one characterized as normal, are found in the main cluster obtained by flow cytometry (Evenson and Jost, 2001). The use of an alternative methodologic approach to assess sperm DNA damage, such as the sperm chromatin dispersion test (SCD), also reveals two main and very distinctive sperm subpopulations, which could be

Supported by the Fund for Health of Spain (FIS) grant PI080623, Generalitat de Catalunya grant 2009 SGR 1107, Ministry of Education and Science of Spain grant BFU2010-16738/BFI, and the Càtedra de Recerca Eugin-Universitat Autònoma de Barcelona.

Correspondence to: A García-Peiró and Dr J Benet, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Spain (e-mail: agusti.garcia@uab.es; jordi.benet@uab.es).

Received for publication March 29, 2011; accepted for publication August 8, 2011.

DOI: 10.2164/jandrol.111.013722

clustered as non-DNA damaged or as containing a fragmented DNA molecule (Fernández et al, 2005). Both are distinguished because the fragmented subpopulation does not show a halo of chromatin dispersion or the halo is minimum, and the nonfragmented subpopulation shows a large halo of relaxed chromatin. Nevertheless, within the subpopulation characterized as presenting fragmented DNA, two different subclasses can be determined. One is characterized by a morphology associated with an absent or small halo of chromatin dispersion, whereas the other exhibits a massive protein and DNA depletion, and it shows a ghostlike morphology referred to as DNA-degraded sperm (DDS). A normal value for DDS seems to range from 1% to 4%, whereas increased values of DDS have been linked to varicocele patients but not to other infertile patients (Enciso et al, 2006). The physiopathology of varicocele has been associated with several factors (Naughton et al, 2001; Will et al, 2011), such as oxidative stress (Mostafa et al, 2006; Pasqualotto et al, 2008), high testicular temperature (Jung and Schuppe, 2007), and an increase of abnormal sperm chromatin condensation (Sadek et al, 2011). With regard to HDS, some studies point to considering an acceptable value of immature sperm when the semen sample contains less than 10% of HDS (Bungum et al, 2004; Zini et al, 2009). An increased HDS sperm subpopulation has been associated with high fever episodes (Evenson et al, 2002) and alterations during the spermiogenesis stage and abnormal morphology (Zini et al, 2009). Then, increased values of both HDS and DDS could be related to abnormal spermiogenesis and infertility. To our knowledge, no reports studying HDS and DDS in the same infertile patients have been published.

The aim of the present investigation is to analyze the relationship between both HDS and DDS subpopulations and their incidence in a series of infertile patients, classified according to their different clinical conditions, compared with fertile donors.

Materials and Methods

Samples

Four different cohorts of individuals were formed. The first cohort included 9 males with astenoteratozoospermia (ATZ); the second group included 10 males, carriers of chromosomal reorganizations (9 reciprocal and 1 inversion). Of these, one was teratozoospermic (TZ) and the rest were within normal semen parameters. The third cohort included 10 ATZ patients with clinical varicocele grade 1 (Dubin grading system). Finally, a control group comprising 8 donors of proven fertility with a normal seminogram was included. Written,

informed consent was given by all patients, and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

To assess HDS and DDS sperm subpopulations, a semen sample of each individual was obtained by masturbation after 3 days of sexual abstinence. Prior to cryopreservation, the fresh ejaculate was allowed to liquefy and then mixed 1:1 with cryopreservation medium (14% glycerol, 30% egg yolk, 1.98% glucose, and 1.72% sodium citrate). After that, samples were aliquoted and incubated at -80°C in an isopropanol bath overnight and then plunged directly into liquid nitrogen until the experiment was performed. For the analysis, all samples were thawed by immersion in a 37°C water bath for 30 seconds and washed three times with PBS buffer at room temperature, and sperm concentration was adjusted according to SCSA and SCD requirements for each case (Evenson et al, 1999; Fernández et al, 2005).

Characterization of HDS Sperm Subpopulations

SCSA protocol has been described elsewhere by Evenson et al (1999). Briefly, an aliquot of the thawed semen sample was diluted to a concentration of 2×10^6 sperm per milliliter in TNE buffer (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris, and 1 mM EDTA, pH 7.4) to a total of 200 μL . Thereafter, 400 μL of acid detergent solution (0.08 M HCl, 0.15 M NaCl, and 0.1% v/v Triton X-100, pH 1.2) were added. After 30 seconds, the sperm was stained for 3 minutes by adding an acridine orange (AO; Molecular Probes, Eugene, Oregon) staining solution containing 6 μg of AO per milliliter of buffer (0.037 M citric acid, 0.126 M Na_2HPO_4 , 1.1 mM EDTA disodium, and 0.15 M NaCl, pH 6.0). A total of 5000 sperm cells were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey). HDS is based on the calculation of the ratio of high green to red + green fluorescence for each sperm (Figure 1a and b). This value corresponds to the percentage of immature sperm with incomplete chromatin condensation, which is indicative, in part, of a nuclear morphologic abnormal status (Zini et al, 2009).

Characterization of DDS Sperm Subpopulations

Samples were assessed for DDS just after they were thawed (t_0), and the value obtained was considered as the baseline for this particular sample. DDS was determined using the Halosperm Kit (Halotech DNA SL, Madrid, Spain). Briefly, the SCD test is based on the principle that sperm with fragmented DNA fail to produce the characteristic halo of dispersed DNA loops, which is observed in nonfragmented DNA sperm (Fernández et al, 2005). An aliquot containing low-melting point agarose was placed in a water bath at 90°C to 100°C for 5 minutes to melt the agarose, and then placed in a water bath at 37°C for 5 minutes to allow for equilibration. Then, 60 μL of the diluted sperm sample were mixed with agarose, and 20 μL of this semen-agarose mixture was pipetted onto an agarose-coated slide, covered with a coverslip, and placed at 4°C for 5 minutes. For DNA denaturation, the coverslip was gently removed and the slide was placed in an acid solution for 7 minutes; for protein depletion, slides containing a denatured DNA molecule were incubated in 10 mL of the lysing solution for 25 minutes. Then, the slides

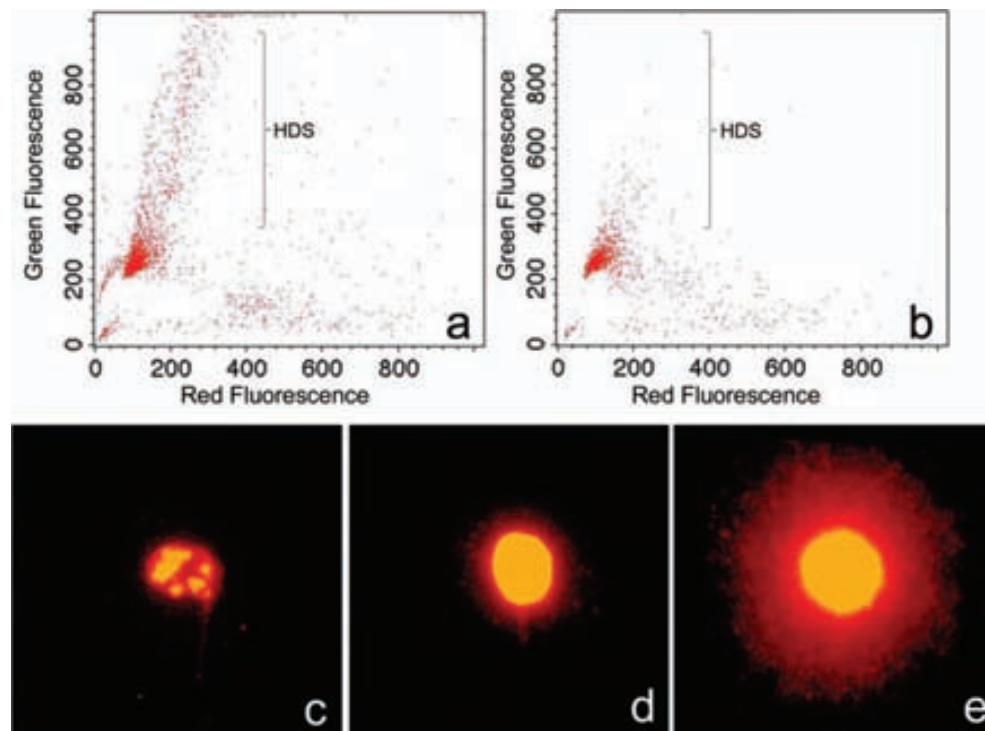


Figure 1. Sperm chromatin structure assay cytogram showing sperm sample with (a) and without (b) a representative high-DNA stainability (HDS) sperm subpopulation. Different types of haloes of sperm DNA were determined with the sperm chromatin dispersion test with propidium iodide staining (c, d, e). Representative DNA-degraded sperm (DDS), without a halo and irregular staining morphology (c), and typical, fragmented DNA sperm, without a halo but with uniform staining (d). A sperm without DNA fragmentation shows a big halo of dispersed chromatin (e).

were washed for 5 minutes with distilled water and dehydrated in 70%, 90%, and 100% ethanol for 2 minutes each, and air dried. Slides were stained for fluorescence microscopy using propidium iodide (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, California).

The DDS subpopulation (Figure 1c) represents a different category of classification of sperm with fragmented DNA according to the SCD criteria. This subpopulation was evaluated as a separated cluster, different from the sperm presenting an absence of the chromatin dispersion halo and considered as containing a DNA-fragmented molecule according to the SCD criteria. For this study, 200 spermatozoa were scored, and the final percentage of degraded sperm is referred to as DDS%.

For in situ nick translation, SCD-processed slides were incubated with a polymerase according to the methodology described previously (López-Fernández et al, 2009). In this case, we increased the time for polymerase action to 1 hour. To capture small, labeled DNA fragments, a high-sensitivity cooled camera (Photometrics Cool Snap; Roper Scientific; USA) was used on a Leica DMRB microscope equipped with a metal-halide light source for fluorescence microscopy and a 60 \times PlanFluotar N.A. 1.3 objective.

Statistical Analysis

Data analysis was performed using the SPSS 15.0 program. Values were compared using the Kruskal-Wallis test or the

ANOVA test with Tukey's b test for intergroup comparisons according to normal criteria. Correlation analysis was studied by Spearman's test. The level of significance was established at a 95% confidence interval ($P < .05$), which is considered to be statistically significant.

Results

Characterization of HDS and DDS Populations

Figure 1a and b shows two different sperm clusters produced after the SCSA analysis, where a differential distribution of the HDS is created. In Figure 1a, the level of HDS is higher, whereas in Figure 1b the proportion of HDS could be considered as being low. After the SCD test, the morphology to identify DDS spermatozoa is quite characteristic because the sperm heads show a low level of fluorescence and present an irregular morphology and distribution of the fluorescence within a small and compact remnant of the sperm head (Figure 1c). They are very distinctive when compared with those representing the major class of sperm containing a fragmented DNA molecule (Figure 1d) and sperm with nonfragmented DNA (Figure 1e). Interestingly, after using an intensive in situ nick translation

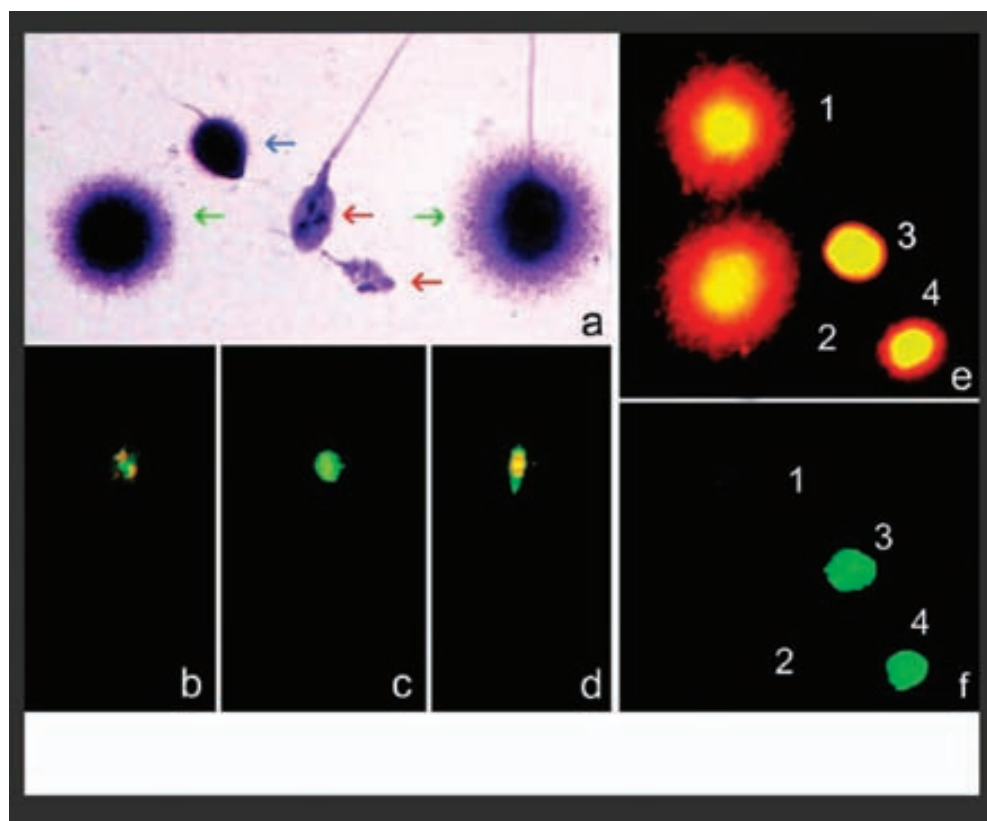


Figure 2. (a) Bright-field microscopy image to show differences among different sperm subpopulations. Sperm without fragmented DNA (green arrows), fragmented sperm (blue arrow), and two different levels of degraded sperm (red arrows). (b, c, d, e, f) ISNT after Halosperm treatment. A series of selected DNA-degraded sperm (DDS) after in situ nick translation (b, c, d) displaying different amounts of discrete DNA fragments (green fluorescence) around a residual chromatin core (red and green fluorescence). (e, f) This stellar aspect around the core is not observed in "standard fragmented" sperm, regardless of the halo absence (3) or presence of a small halo (4). Unfragmented sperm is mostly free of INST DNA labeling (1 and 2 in f).

(Figure 2b through f), those spermatozoa representing the DDS class exhibit a visible halo of small, extended DNA fragments displaying a huge halo of stellar appearance (Figure 2b through d). This stellar halo, formed with small DNA fragments, is not visualized in standard SCD-processed slides with a direct fluorochrome staining (Figure 1c), even less so with bright-field microscopy (Figure 2a).

Determination of HDS% and DDS%

- 8 Data obtained for HDS% and DDS% are displayed in Figure 3. HDS% and DDS% averaged 10.83 ± 3.72 (range, 4.87–15.85) and 2.62 ± 1.68 (range, 1–6), respectively, in fertile control sperm ($n = 8$), compared with 14.01 ± 6.55 (range, 5.77–35.6) and 11.01 ± 7.42 (range, 1.5–30), respectively, in sperm obtained from a group of all patients with pathologies of the reproductive system ($n = 29$; Figure 3a). DDS% was significantly higher in the group of patients than in the controls ($P = .001$). There were no significant differences in sperm HDS% ($P = .245$). When compared between the three

pathologic conditions (ATZ, rearranged genome, and ATZ with clinical varicocele), HDS% and DDS% values were 11.74 ± 2.36 (range, 9.19–13.87) and 3.88 ± 1.55 (range, 1.5–6); 13.03 ± 3.92 (range, 7.43–18.64) and 11.6 ± 5.23 (range, 4–20); and 17.04 ± 9.84 (range, 5.77–35.6) and 16.85 ± 7.24 (range, 5.5–30), respectively (Figure 3b). There were no significant differences among patient subgroups for HDS% ($P = .542$). For the DDS%, statistical differences were detected between the ATZ patients and both the clinical varicocele and rearranged-genome groups ($P < .001$). No statistical differences were found between patients with a rearranged genome and those diagnosed with clinical varicocele ($P > .05$).

Sperm DNA Fragmentation Assessment

The sperm DNA fragmentation values were also determined using both SCSA and SCD methodologies. For the SCSA, the DNA fragmentation index (DFI%) average was 13.75 ± 5.8 in fertile donors, compared with 25.07 ± 10.90 in the total number of patients.

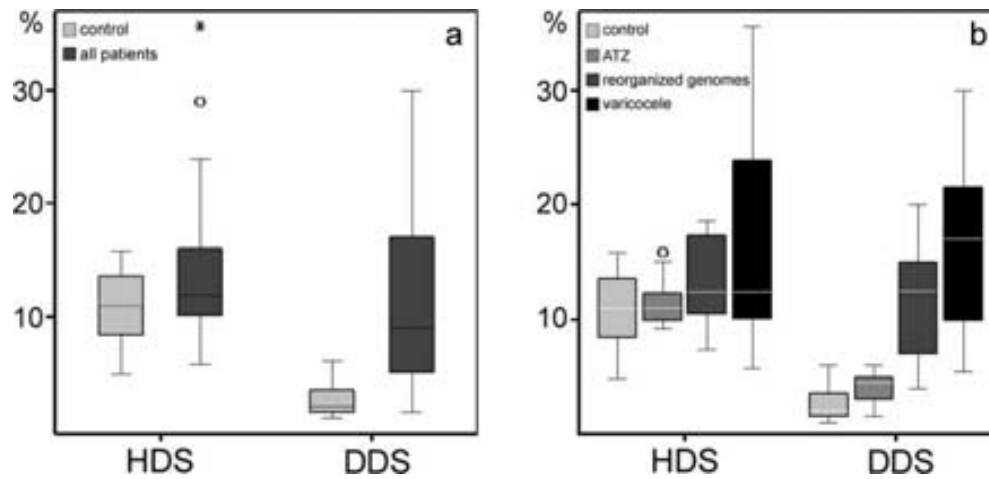


Figure 3. Box-and-whisker plots for the HDS% and final percentage of degraded sperm (DDS%) observed (a) for control and all patient groups, and (b) according to the patient's clinical condition: fertile donors, ATZ, reorganized genomes, and clinical varicocele.

DFI% was significantly higher in the group of patients than in the controls ($P = .001$). Similar results were obtained with the SCD method. Values for the sperm DNA fragmentation (SDF%) average were 13.12 ± 4.42 in fertile donors, whereas in the patient group the values were 29.24 ± 12.62 . Statistical differences were also obtained ($P = .001$). Finally, statistically significant differences were not observed among the different groups of patients according to their pathologic condition ($P > .05$).

Correlation of HDS% and DDS%

The correlation analysis included all variables in this study. A strong correlation between DFI% and SDF% was obtained ($r = 0.817$; $P < .001$). Moreover, DDS% was also correlated with SDF% ($r = 0.517$; $P = .001$) and DFI% ($r = 0.468$; $P = .003$), but no correlation was obtained between HDS% and DDS% ($r = 0.196$; $P = .244$; Figure 4) or any of the other variables.

Discussion

The results presented in this experimental approach show that HDS and DDS represent two different sperm subpopulations in the ejaculate, indicating a different origin for the chromatin damage observed in each subpopulation. Whereas HDS seems to be the product of immature spermatozoa that failed to have a complete and precise protamine assembly during histone/protamine replacement or chromatin compactness (Evenson and Wixon, 2006; Zini et al, 2009), the DDS population seems to be the product of a massive DNA breakage. This interpretation is congruent with the results obtained with ISNT, where small and discrete DNA motifs detached from ghostlike sperm were observed. This massive sperm DNA damage is probably produced during the sperm epididymal transition and is probably related to a massive DNA attachment on sperm heads that are deficient for a normal protamination and overexposed to highly reactive reactive oxygen species. For some unknown reason the DNA of these sperm is highly vulnerable, and the result of an excessive oxidative stress provokes the massive presence of single- and double-strand breaks (in preparation). In some sense, these results are congruent with our previous

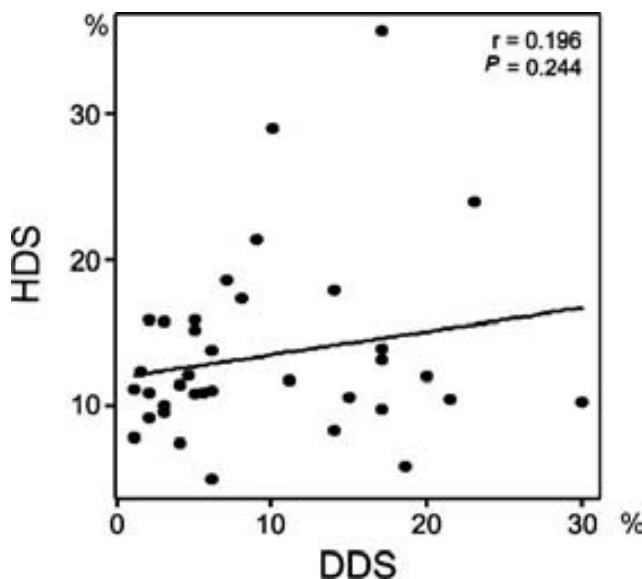


Figure 4. Graph of dispersion showing that no correlation between the percentage of high-DNA stainability (HDS) and DNA-degraded (DDS) spermatozoa exists.

observations where we demonstrated that alterations in the P1/P2 ratio correlate with the level of sperm DNA damage and also with the rate of sperm DNA damage observed after postejaculation (Aoki et al, 2005, 2006; García-Peiró et al, 2011). This could be the most parsimonious explanation for the high frequency of DDS observed in varicocele patients, where the level of reactive oxygen species exposure is extremely high (Allamaneni et al, 2004; Mancini et al, 2004; Agarwal et al, 2006; Mostafa et al, 2006; Pasqualotto et al, 2008).

Taking into account that the ejaculate is a mixture of different sperm subpopulations that can be characterized in terms of sperm motility, differences in the membrane properties, head morphology, and some other properties, it is interesting to highlight that the combined use of SCSA and SCD is able to subclassify different subpopulations in terms of sperm DNA fragmentation. When faced with the polemic viewpoint about the interest of assessing sperm DNA damage in relation to fertility (Zini and Sigman, 2009), the results provide evidence that sperm DNA damage could not be considered as a homogenous concept where all of the results are comparable. Thus, although the nature of DNA damage is not identical when it originates from oxidative stress, producing nucleotide modifications based on the presence of 8-oxoG and others (Badouard et al, 2008), or the observed DNA damage gives rise to single- or double-strand breaks (Enciso et al, 2009), these different scenarios of DNA damage are not comparable. Hence, the consequences on fertility would not be expected to be equivalent. In our experimental approach, although SCSA is able to distinguish HDS subpopulations, SCD is unable to identify this class. Similarly, SCD identifies the DDS subpopulation, whereas SCSA fails to identify such a class. Integrating this information, let us assume that using SCSA and SCD, in each ejaculate we can distinguish at least four different subpopulations—the first subpopulation containing spermatozoa with an orthodox unfragmented DNA molecule, the second subpopulation containing a fragmented DNA molecule, the third subpopulation containing the so-called HDS representing immature spermatozoa, and finally, the fourth subpopulation, DDS, containing the highly fragmented DNA molecule. The impact on fertility of the relative presence of these subpopulations is not known, but we may expect different effects on the fertility potential of different patients according to the distribution of each subpopulation. In fact, we may assume that the DDS subpopulation may have a highly negative effect on fertility, because it is highly represented in patients with diminished fertility capacities, such as varicoceles and rearranged genomes. This is the reason why the presence of HDS and DDS could be indicative of a pathologic

situation, but probably to a different extent in terms of consequences for fertility. For the overall set of samples, we found that these two populations are always present in the ejaculate to some degree. However, in attending the clinical condition of the patient, increased values with respect to the control group were found. This observation was more obvious for the DDS population, which presented statistically increased values with respect to the control group, for both cohorts of patients, whereas for HDS, only in some patients with varicocele can we observe higher values of this sperm subpopulation.

Although not too much specific attention has been paid in the literature to HDS and DDS sperm subpopulations, mainly because most of the efforts were conducted to understand the actual role of fragmented vs unfragmented sperm, Enciso et al (2006), coincident with the results reported here, found a statistical increase in the population of DDS subpopulations in varicocele patients. However, the DDS subpopulation is not increased in other infertile patients with or without normal semen parameters. In the present study, an additional statistically increased value was found for the DDS subpopulation in semen samples from carriers of rearranged genomes. This observation may suggest that even in very different groups, under the etiologic point of view, these patients may share a common feature in the production of DNA damage. One explanation for that could be related to the presence of immature sperm. Immaturity is a frequent occurrence in spermatozoa of patients with varicocele (Talebi et al, 2008). Many reports have suggested that alterations in the topoisomerase I or an increase in testicular temperature could be related to this fact (Fujisawa et al, 1988; Wright et al, 1997; Jung and Schuppe, 2007). Moreover, chromosomal rearrangement carriers also tend to have increased percentages of immature sperm (Sun et al, 2006). Although, in this study we found no correlation between HDS and DDS, thus suggesting that they are different sperm subpopulations, and the percentage of immature sperm in patients with varicocele or carriers of chromosomal rearrangements seems to be associated with the presence of the degraded DNA sperm form. This would suggest that chromatin immaturity is a necessary prerequisite favoring sperm production of degraded sperm, a fact that, indirectly, could link the HDS and DDS subpopulations.

Finally, we wish to state that DDS forms were statistically increased in both groups of patients—varicocele and carriers of genome reorganization—but different from ATZ and control fertile donors. This could be interesting in the diagnostic area, because confirmation of these results could be of clinical relevance for the identification of patients with a

putative chromosomal translocation or men with varicocele. Karyotype and Doppler examination must be performed to confirm the diagnosis in patients exhibiting a high rate of DDS, especially when HDS is also increased.

Acknowledgments

We would like to thank Raquel Torres for technical assistance and Chuck Simmons for the English revision of this manuscript.

References

- Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:630–633.
- Allamaneni SS, Naughton CK, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertil Steril*. 2004;82:1684–1686.
- Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl*. 2006;27:890–898.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl*. 2005;26:741–748.
- Badouard C, Ménéz Y, Panteix G, Ravanat JL, Douki T, Cadet J, Favier A. Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote*. 2008;16:9–13.
- Buffone MG, Doncel GF, Marín Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Calamera JC. Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. *Hum Reprod*. 2004;19:139–146.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod*. 2004;19:1401–1408.
- Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejó JM, Ardoy M, Pacheco A, Gosálvez J. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl*. 2006;27:106–111.
- Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL, Gosálvez J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009;18:609–616.
- Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. *Curr Protoc Cytom* 2001; Chapter 7:Unit 7.13.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14:1039–1049.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002;23:25–43.
- Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*. 2006;65:979–991.
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005;84:833–842.
- Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, Kojima K, Kamidono S. Decrease of topoisomerase I activity in the testes of infertile men with varicocele. *Arch Androl*. 1988;21:45–50.
- García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Jones C, Coward K, Gosálvez J, Benet J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril*. 2011;95:105–109.
- Jung A, Schuppe HC. Influence of genital heat stress on semen quality in humans [review]. *Andrologia*. 2007;39:203–215.
- Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates [review]. *Fertil Steril*. 2008;90:352–359.
- López-Fernández C, Gage MJ, Arroyo F, Gosálbez A, Larrán AM, Fernández JL, Gosálvez J. Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (*Tinca tinca*: Teleostei, Cyprinidae) measured using a sperm chromatin dispersion test. *Reproduction*. 2009;138:257–266.
- Mancini A, Meucci E, Milardi D, Giacchi E, Bianchi A, Pantano AL, Mordente A, Martorana GE, de Marinis L. Seminal antioxidant capacity in pre- and postoperative varicocele. *J Androl*. 2004;25:44–49.
- Mostafa T, Anis TH, Ghazi S, El-Nashar AR, Imam H, Osman IA. Reactive oxygen species and antioxidants relationship in the internal spermatic vein blood of infertile men with varicocele. *Asian J Androl*. 2006;8:451–454.
- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2001;7:473–481.
- Pasqualotto FF, Sundaram A, Sharma RK, Borges E Jr, Pasqualotto EB, Agarwal A. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. *Fertil Steril*. 2008;89:602–607.
- Sadek A, Almoahmy AS, Zaki A, Aref M, Ibrahim SM, Mostafa T. Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. *Fertil Steril*. 2011;95:1705–1708.
- Sun F, Ko E, Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;25(4):1.
- Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasezadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia*. 2008;40:245–251.
- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl*. 2001;22:382–394.
- Will MA, Swain J, Fode M, Sonksen J, Christman GM, Ohl D. The great debate: varicocele treatment and impact on fertility. *Fertil Steril*. 2011;95:841–852.
- Wright EJ, Young GP, Goldstein M. Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men. *Urology*. 1997;50:257–259.
- Zini A, Phillips S, Courchesne A, Boman JM, Baazeem A, Bissonnette F, Kadoch IJ, San Gabriel M. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2009;91:2495–2500.
- Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful?: pros and cons. *J Androl*. 2009;30:219–229.

4.5. ARTÍCULO 5

Título: Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and sub-populations of sperm with highly degraded DNA

Autores: Agustín García-Peiró, Carlos Abad, María José Amengual, Naim Hannaoui, Jaime Gosálvez, Kevin Coward, Juan Prats and Jordi Benet

Publicación: Andrologia (aceptado)

Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and sub-populations of sperm with highly degraded DNA

Running Title: antioxidant effect on sperm DNA

Carlos Abad, M.D.,¹ María José Amengual, Ph.D.,² Jaime Gosálvez, Ph.D.,³ K. Coward, Ph.D.,⁴ Naim Hannaoui, M.D.,¹ Jordi Benet, Ph.D.,⁵ Agustín García-Peiró, MSc.,⁶ and Juan Prats, PhD.¹

¹Servei d'Urologia, ²UDIAT, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Spain; ³Departamento de Biología, Unidad de Genética, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. ⁴Nuffield Department of Obstetrics & Gynaecology, Level 3, Women's Centre, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford. UK. ⁵Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, ⁶Càtedra de Recerca Eugin-UAB, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain;

Corresponding Author: A. García-Peiró, M.Sc.
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)
08193 Bellaterra, Spain
Phone: +34 935811773;
Fax: +34 935811025;
E-mail: agusti.garcia@uab.es

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Supported by the FIS (PI080623), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1107), Ministry of Education and Science, Spain - Grant BFU2010-16738/BFI and Càtedra de Recerca Eugin-UAB.

Abstract

The primary aim of this study was to determine the effect of oral antioxidant treatment upon the dynamics of sperm DNA fragmentation following varying periods of sperm storage (0h, 2h, 6h, 8h and 24h) at 37°C in a cohort of 20 infertile patients diagnosed with asthenoteratozoospermia. A secondary objective was to use the sperm chromatin dispersion test (SCD) to study antioxidant effects upon a specific subpopulation of highly DNA degraded sperm (DDS). Semen parameters and pregnancy rate (PR) were also determined. Results showed a significant improvement of DNA integrity at all incubation points ($p < 0.01$). The proportion of DDS was also significantly reduced ($p < 0.05$). Semen analysis data showed a significant increase in concentration, motility, vitality and morphology parameters. Our results suggest that antioxidant treatment improves sperm quality not only in terms of key seminal parameters and basal DNA damage, but also helps to maintain DNA integrity. Prior administration of antioxidants could therefore promote better outcomes following assisted reproductive techniques.

Key Words: Human spermatozoa, infertility, DNA damage, antioxidants, L-carnitine

Introduction

Sperm DNA damage has been shown to represent a critical factor that may have important consequences for pregnancy or during subsequent embryonic development (Zini et al., 2008; Bungum et al., 2007; Puscheck and Jeyendran, 2007). Many studies, using a variety of methodological approaches, have attempted to understand the causes and mechanisms by which DNA damage is incurred. General consensus of opinion suggests that the most likely underlying mechanisms include alterations in compaction of the sperm nucleus during spermiogenesis, imbalanced production of reactive oxygen species (ROS), and nuclease activity in apoptosis-like processes (Aoki et al., 2005; de Iuliis et al., 2009; Sakkas et al., 2004). Oxidative stress can influence the potential to fertilize because damage to the sperm membrane can result in poor motility and loss of ability to fuse with the oocyte (Tremellen, 2008). In addition, oxidative stress induces base adduct modifications in DNA resulting in generalized breaks of the paternal genome (Badouard et al., 2008; Santiso et al., 2010). In patients with varicocele, it has been suggested that oxidative stress could exert effect upon the ratio of protamine 1 to protamine 2 (García-Peiró et al., 2011). Other studies have suggested that oxidative stress can induce caspase activity and the activation of endonucleases, processes that ultimately lead to DNA fragmentation (Sailer et al., 1997). Consequently, it appears that oxidative stress is a key determinant factor that can adversely affect male fertility at a series of interconnected structural and functional levels. The efficacy of antioxidant supplementation in sub-fertile males has therefore become the subject of much research interest (Greco et al., 2005; Ménézso et al., 2007; Piomboni et al., 2008). In this regard, a recent meta-analysis showed that antioxidants may improve live birth outcome and pregnancy rate for sub-fertile

couples undergoing ART cycles (Showell et al., 2011). As a consequence, treatment with oral antioxidants is often included as a common therapeutic strategy in order to improve sperm quality. However, the precise effects of antioxidants upon sperm quality remain unclear and there is still a lack of confidence concerning the effectiveness of such treatment, particularly as conflicting results are evident in the published literature relating to antioxidant properties and DNA damage (Silver et al., 2005; Tunc et al., 2009).

The purpose of the present study was to explore, in a series of well-defined groups of infertile patients with known asthenoteratozoospermia, the effect of oral antioxidants administered over three months upon basal sperm DNA fragmentation (T0-SDF) and following different incubation periods at 37°C (T2, T6, T8, T24), in order to determine if antioxidant therapy is able to exert protective effects upon sperm DNA longevity. In addition, a degraded sperm (DDS) subpopulation, a specific sperm subpopulation with high levels of DNA degradation, were characterised using the sperm chromatin dispersion test (SCD) (Fernández et al 2005; Enciso et al; 2006; García-Peiró et al; 2011), Finally, sperm parameters and pregnancy rates were also determined. To our knowledge there are no other published reports concerning the effect of oral antioxidant therapy upon the dynamics of sperm DNA fragmentation and the presence of DDS.

Materials and Methods

Study Design and Patient Selection

Twenty infertile men with known asthenoteratozoospermia (WHO, 1999) in at least two previous semen analyses were selected between March 2010 and February 2011. Patients with genitourinary inflammation, leukocytospermia, history of autoimmune

disease, or altered hormonal profiles, were not included in this study. At the time the study began, none of the patients had been pre-treated with antioxidants or medicated for anything other condition. Patients who required treatment during the study for other reasons (mainly influenza) were also excluded. Sperm parameters and sperm DNA fragmentation following different incubation times were determined before and after three months of antioxidant treatment with commercial multi-vitamins (Androferti, Q Pharma Laboratories; Alicante, Spain) containing L-Carnitine (1500 mg), vitamin C (60mg), coenzyme Q10 (20mg), vitamin E (10mg), vitamin B9 (200µg), vitamin B12 (1 µg), Zinc (10mg) and selenium (50 µg). Successful pregnancy during treatment and at 3 months thereafter was confirmed by telephone interview. Written informed consent was given by all patients, and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

Sample collection and preparation

Semen samples were obtained from all patients after three days of sexual abstinence, both before and after treatment with oral antioxidants. Fresh ejaculate was allowed to liquefy and a small amount of sample reserved for the determination of sperm parameters. The remaining sample was mixed 1:1 with test yolk buffer cryopreservation medium containing (14% (v/v) glycerol, 30% (v/v) egg yolk, 1.98% (w/v) glucose and 1.72% (w/v) sodium citrate), aliquoted and incubated overnight at -80°C in an isopropanol bath, and finally cryopreserved in liquid nitrogen until the experiment was performed.

Determination of Semen Parameters

Key sperm parameters including total sperm count, concentration, motility (progressive type a, b and a+b), vitality and morphology, were determined according to

World Health Organization guidelines (WHO, 1999). The Sperm Class Analyzer (SCA, Microptic, Barcelona; Spain) was used to determine concentration and motility parameters, while vitality was assessed by eosin/nicrosin staining, and morphology analyzed following Kruger's strict criteria (Kruger et al., 1986). In order to retain consistency, sperm analyses were carried out by the same observer each time.

Temporal assessment of Sperm DNA fragmentation

All samples included in this study were incubated at 37°C in PBS buffer for 30 seconds, washed three times in PBS, and sperm concentration adjusted to 10 million per millilitre. Then, samples were incubated at 37°C and sperm DNA fragmentation (SDF), the ratio of fragmented versus total spermatozoa in the analyzed sample, expressed as a percentage, assessed after 0h, 2h, 6h, 8h and 24 hours of incubation using the Sperm Chromatin Dispersion test (SCDt) (Halosperm Kit, Halotech DNA, S.L; Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. Slides were stained for fluorescence microscopy using propidium iodide (2.5 µgr/mL in Vectashield; Vector Laboratories; Burlingame, CA) and 200 spermatozoa were scored for each experimental point. The percentage of DNA degraded sperm (DDS), a discrete population of specific sperm exhibiting highly significant levels of protein depletion and DNA damage, were determined and expressed as the ratio of DDS versus the total number of sperm analyzed (García-Peiró et al., 2011; Enciso et al., 2006). The rate of sperm DNA fragmentation (rSDF), defined as the increase in DNA fragmentation measured between two periods of time (T24-T0) was also determined.

Statistical Analysis

Data analyses were performed using the Statistics Package for the Social Sciences software, version 15 (SPSS, Chicago, IL). Values were compared using the Wilcoxon test for related samples and the level of significance was established at 95% of the confidence interval (CI).

Results

Semen Parameters

Sperm parameters before and after oral antioxidant therapy are described in Table 1. Statistical differences were detected for concentration ($p < 0.05$), type a and a+b motility ($p < 0.05$), vitality ($p < 0.01$) and morphology ($p < 0.05$). All parameters exhibited statistically significant improvement, with the exception of total sperm and type b motility, which did not improve ($p > 0.05$).

Sperm DNA damage after different periods of incubation

The progression of sperm DNA fragmentation over increasing incubation time at 37°C before and after treatment with oral antioxidants are summarized in Table 2 and Figure 1. In general, there was a statistical improvement in sperm DNA integrity analysed at each experimental time point. Statistical differences were detected for all incubation points. Following oral antioxidant therapy, the rate of sperm DNA fragmentation was significantly lower ($p < 0.01$) and sperm DNA integrity was more conserved.

DNA Degraded Sperm

DDS results are shown in Table 2 and Figure 2. Following antioxidant treatment, this specific type of sperm with high levels of DNA damage were significantly reduced ($p < 0.05$).

Pregnancy Rate Following Antioxidant Treatment

The wives of four initial study participants who were administered antioxidant supplementation became pregnant just three months after beginning treatment. However, one patient's wife experienced miscarriage. As a consequence, the calculated on-going pregnancy rate was 15%. However, two patients who failed to produce a sample for analysis following treatment were excluded from the study. Therefore, in strict terms, the treatment was considered to determine pregnancy rate in only one case, and was judged to be approximately 5%.

Discussion

This research was conducted to determine whether treatment with oral antioxidants could help to improve sperm quality in selected patients with ATZ (WHO, 1999). For this purpose, semen parameters, DNA fragmentation, and pregnancy rate were determined. Moreover, specific attention was paid to two aspects of sperm DNA fragmentation: a) the dynamics of sperm DNA fragmentation and b) DNA degraded sperm (DDS), a different sperm subpopulation characterized by highly fragmented DNA and protein depletion (Enciso et al., 2006). To our knowledge, the effect of oral antioxidants has not been previously investigated in relation to these two aspects of sperm DNA damage.

Several reports have previously shown that oral antioxidant therapy can improve sperm quality (Suleiman et al., 1996; Scott et al., 1998). In one of these previous reports, it was demonstrated that antioxidant therapy with L-carnitine led to significant improvement of the main functional semen parameters (de Rosa et al., 2005). In the current study, we also observed a statistical improvement in key semen parameters following treatment with an antioxidant. Significant improvements were particularly detected for forward motility and the percentage of viable sperm (Table 1). This observation was also reported in a previous study using carnithines as the main treatment compound (Vicari et al., 2001).

When considering sperm DNA integrity, we observed reduced proportions of sperm with basal DNA fragmentation (t0) following antioxidant treatment. This is consistent with several existing reports reporting similar improvements of sperm DNA integrity following treatment with another type of antioxidant such as C or D vitamin or both (Greco et al., 2005; Menezo et al., 2007).

However, the precise mechanisms by which antioxidant treatment reduces DNA fragmentation have not yet been fully clarified and has only been shown to exert a protective effect *in vitro* (Zini et al., 2009). In the current study, we observed greater longevity of DNA integrity following antioxidant therapy. Furthermore, the rate of sperm DNA fragmentation was statistically reduced. This observation could be related to greater efficacy during the replacement of histones by protamines during spermiogenesis since a previous study reported that the P1/P2 ratio was significantly correlated with the rate of DNA fragmentation (García-Peiró et al., 2011). Therefore, antioxidants may help to improve sperm DNA integrity acting not only at the level of neutralizing exogenous oxidants, but also by improving the process of sperm nucleus remodelling. This step is crucial, since the effectiveness of this process may ultimately depend upon the

susceptibility of nuclear DNA to damage (de Iuliis et al., 2009). This observation could be strengthened by the fact that sperm morphology was also improved following treatment (Table 1).

Although there are conflicting results concerning the effect of antioxidants to improve fertility, the general perception of this current study is that oral antioxidant therapy can significantly improve the quality of sperm in ATZ males, and in consequence, this course of treatment would be highly recommended. However, not all patients respond to such treatment in the same way, and in some cases, the effect is more pronounced than in others. This fact, suggests that in order to improve the rate of pregnancies and births, specific markers of damage related to ROS or other factors, should be investigated to ascertain what specific treatment would be more effective (type of antioxidant, dose and duration of treatment) for each specific patient group classified in accordance with their specific clinical characteristics. For example, the DDS subpopulation exhibits a highly varied presence in semen samples overall, although recent papers have reported that this sperm subpopulation has a statistically increased presence in varicocele patients (Enciso et al., 2006) and carriers of reorganized genomes (García-Peiró et al, 2011). DDS are characterized by a high degree of DNA fragmentation and protein depletion that can only be identified by the sperm chromatin dispersion test (SCD) using either bright field or fluorescence microscopy (Fernández, et al., 2005). In the current report, the DDS subpopulation was statistically reduced following antioxidant therapy. Consequently, it would be plausible to consider that this treatment might be more effective in patients who have a very high percentage of DDS, for example in patients with varicocele where the DDS subpopulation can represent up to 20% of sperm with fragmented DNA. In fact, the production of DDS would be related with ROS since patients with varicocele present with

oxidative stress levels much higher than other patients and fertile donors (Pasqualotto et al., 2008). Consequently, it is expected that the effect of antioxidant treatment would manifest more effectively in this type of patient group.

In conclusion, the results of this current study indicate that oral antioxidant treatment in infertile patients diagnosed with ATZ leads to a significant improvement of sperm quality, as shown by analysis of key sperm parameters, particularly vitality and progressive motility. Basal sperm DNA quality and longevity were also improved. Moreover, the proportion of DDS was also significantly reduced. However, it is important to note that not all patients experienced improvement in sperm quality and further studies are needed to improve these antioxidants treatments or direct them to specific patients groups.

Acknowledgements

Supported by the FIS (PI080623), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1107), Ministry of Education and Science, Spain - Grant BFU2010-16738/BFI and Càtedra de Recerca Eugin-UAB.

References

García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Amengual MJ, López-Fernández C, Gosálvez J, Benet J. Differential clustering of sperm subpopulations in infertile males with clinical varicocele and carriers of rearranged genomes. *J Androl.* 2011; Aug 11. [Epub ahead of print]

Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl.* 2005; 26:741-8.

Badouard C, Ménézo Y, Panteix G, Ravanat JL, Douki T, Cadet J, Favier A. Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote.* 2008; 16:9-13.

Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod.* 2007; 22:174-9. Epub 2006 Aug 18.

De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod.* 2009; 8:517-24. Epub 2009 Jun 3.

De Rosa M, Boggia B, Amalfi B, Zarrilli S, Vita A, Colao A, Lombardi G. Correlation between seminal carnitine and functional spermatozoal characteristics in men with semen dysfunction of various origins. *Drugs R D*. 2005; 6:1-9.

Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejo JM, Ardoy M, Pacheco A, Gosálvez J. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl*. 2006;27:106-11.

Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005; 84:833-42.

García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Jones C, Coward K, Gosálvez J, Benet J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril*. 2011; 95:105-9. Epub 2010 Jul 29.

García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, Gosálvez J, Benet J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl*. 2011; Apr 28. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01153.x. [Epub ahead of print]

Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl.* 2005; 26:349-53.

Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.* 1986; 46:1118-23.

Ménézo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clément P, Benkhalifa M. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14:418-21.

Pasqualotto FF, Sundaram A, Sharma RK, Borges E Jr, Pasqualotto EB, Agarwal A. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. *Fertil Steril.* 2008; 89:602-7. Epub 2007 May 7.

Piomboni P, Gambera L, Serafini F, Campanella G, Morgante G, De Leo V. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian J Androl.* 2008; 10:201-6. Epub 2007 Dec 20.

Puscheck EE, Jeyendran RS. The impact of male factor on recurrent pregnancy loss. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007; 19:222-8.

Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl.* 1997; 18:294-301.

Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W, Bizzaro D. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Hum Fertil (Camb)*. 2004; 7:99-103. Review.

Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertil Steril*. 2010; 93:314-8. Epub 2009 Sep 11.

Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol*. 1998; 82:76-80.

Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; Jan 19;(1):CD007411.

Silver EW, Eskenazi B, Evenson DP, Block G, Young S, Wyrobek AJ. Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *J Androl*. 2005; 26:550-6.

Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl*. 1996; 17:530-7.

Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008; 14:243-58. Epub 2008 Feb 14.

Tunc O, Thompson J, Tremellen K. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reprod Biomed Online*. 2009; 18:761-8.

Vicari E, Calogero AE. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostato-vesiculo-epididymitis. *Hum Reprod*. 2001; 16:2338-42.

World Health Organization (1999) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction*. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008; 23:2663-8. Epub 2008 Aug 29. Review.

Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet*. 2009; 26:427-32. Epub 2009 Sep 19. Review

Figure Legends

Figure 1 Box-and-whisker plots for DDS% observed before and after antioxidant therapy.

Figure 2 Box-and-whisker plots for SDF% before and after antioxidant treatment over different incubation points (0h, 2h, 6h, 8h and 24h) at 37°C .

Table 1 Summary of key seminal parameters before and after antioxidant treatment.

	Before treatment	After treatment (3 months)	P value
	mean \pm SD; rank	mean \pm SD; rank	
Sperm/mL	69.75 \pm 44.08 (12-175)	69.85 \pm 50.55 (9-217)	0.042*
Total sperm	156.39 \pm 86.73 (28-316)	177.46 \pm 116.24 (38-478)	0.47
Type A motility (%)	13.54 \pm 9.57 (0.20-32)	20.02 \pm 12.33 (3.10-50)	0.02*
Type B motility (%)	15.20 \pm 13.04 (2-58)	17.57 \pm 9.96 (7-50)	0.15
Type A + B motility(%)	28.94 \pm 19.93 (2.3-72)	37.59 \pm 16.44 (11-73)	0.04*
Vitality (%)	45.31 \pm 19.72 (14-78)	57 \pm 14.56 (25-80)	0.002**
Normal morphology (%)	4.10 \pm 3.21 (0-11)	5.57 \pm 5.64 (0-17)	0.04*

* 0.05 statistical significance threshold // ** 0.01 statistical significance threshold

Table 2 Data summary, expressed as percentage, for the DNA degraded sperm (DDS) and for the sperm DNA fragmentation (SDF) measured at different experimental points.

	Before treatment	After treatment (3 months)	P value
	mean ± SD; rank	mean ± SD; rank	
DDS	7.32±4.12 (1.90-17.10)	5.66±3.21 (1.20-15.8)	0.04*
SDF0h	28.5±14.97 (14-66,5)	20.12±8.26 (8.5-35.5)	0.004**
SDF2h	28.77±13.45 (12.5-60)	20.7±8.42 (10-37)	0.003**
SDF6h	31.65±12.44 (16-63.5)	23.07±11.63 (8.5-46.5)	0.004**
SDF8h	34.9±12.92 (18-68)	25.87±10.13 (10-46)	0.006**
SDF24h	53.97±21.94 (20-100)	33.02±13.35 (12-77.5)	0.0002**

* 0.05 statistical significance threshold /** 0.01 statistical significance threshold

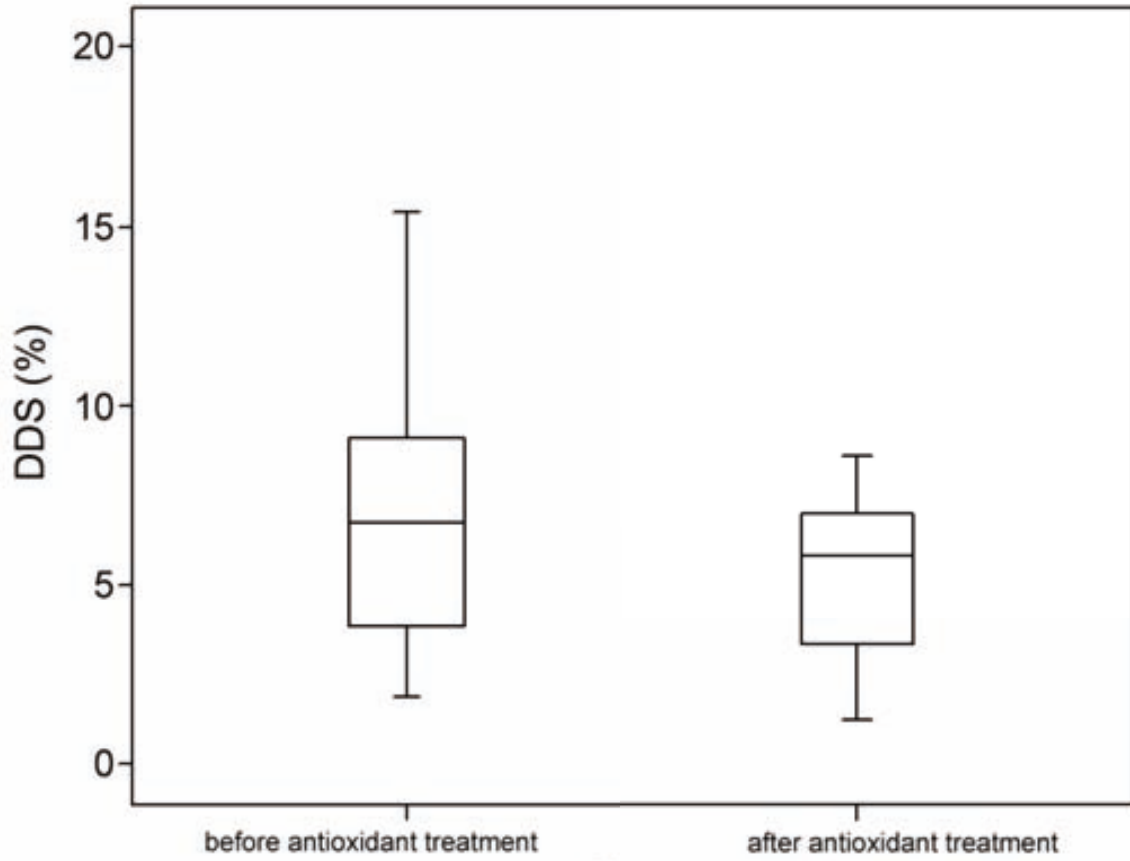


Figure 1

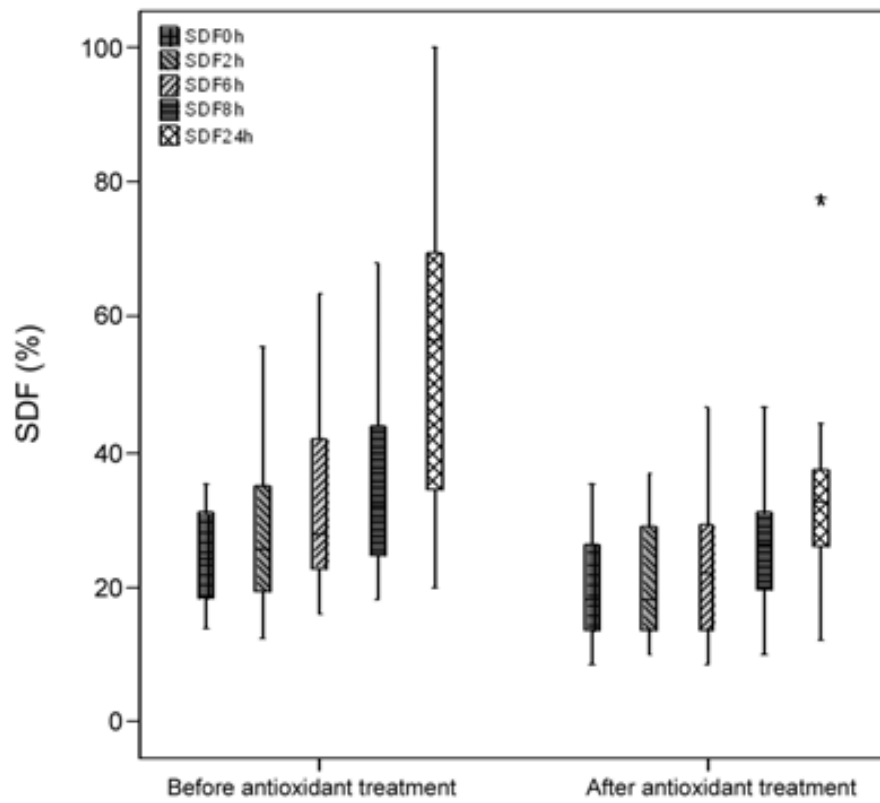


Figure 2

4.1. ARTÍCULO 6

Título: Multiple determination of sperm DNA fragmentation in infertile patients with clinical and subclinical varicocele regarding with the surgical treatment

Autores: Agustín García-Peiró, María Oliver-Bonet, Naim Hannaoui, Joaquina Navarro, Carlos Abad, María José Amengual, Jaime Gosálvez and Jordi Benet

Publicación: en revisión

Multiple determination of sperm DNA fragmentation in infertile patients with clinical and subclinical varicocele regarding with the surgical treatment

Running Title: DNA integrity in varicocele patients

Agustín García-Peiró, M.S,^{1,2} María Oliver-Bonet, Ph.D.,¹ Naim Hannaoui, M.D.,³ Joaquina Navarro, Ph.D.,¹ Carlos Abad, M.D.,³ María José Amengual, Ph.D.,⁴ Jaime Gosálvez, Ph.D.⁵ and Jordi Benet, Ph.D.¹

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, ²Càtedra de Recerca Eugin-UAB, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ³Servei d'Urologia, ⁴UDIAT, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Spain; ⁵Departamento de Biología, Unidad de Genética, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

Corresponding Author: A. García-Peiró M.S and J. Benet, Ph.D.
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i
Immunologia. Facultat de Medicina,
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)
08193 Bellaterra, Spain
Phone: +34 935811773;
Fax: +34 935811025;
E-mail: agusti.garcia@uab.es ; jordi.benet@uab.es;

Conflict of interest

The authors declare non conflict of interest

Acknowledgements

Supported by the FIS (PI080623), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1107), Ministry of Education and Science, Spain - Grant BFU2010-16738/BFI and Càtedra de Recerca Eugin-UAB. We would like to thank Raquel Torres for technical assistance and Chuck Simmons for the English revision of this manuscript.

Abstract

Objective To determine the sperm quality in four different groups of patients diagnosed of varicocele and to determine the effect of surgical treatment.

Design Prospective study.

Setting University Medical School and Hospital.

Patient(s) Sixty infertile patients with varicocele (15 clinical varicocele, 19 clinical varicocele after surgical treatment; 16 subclinical varicocele and 10 subclinical varicocele after surgical treatment)

Intervention(s) varicocelectomy by Buntz method were performed in 29 of the patients. For sperm quality assessment, seminogram, TUNEL, SCSA and SCD analysis were done.

Main Outcome Measure(s) The main parameters of seminograma were analysed. Percentage of Sperm with DNA fragmentation (SDF), High DNA stainibility (HDS) and DNA Degraded Sperm (DDS) were calculated.

Result(s): a good correlation between methods to determine sperm DNA damage were found, but important differences in individual values are also observed. Clinical and subclinical varicoceles have similar sperm quality but, while varicocelectomy improves sperm quality in patients with clinical varicocele, in patients with subclinical varicocele treatment does not improve sperm quality.

Conclusion(s) Infertile patients with clinical and subclinical varicocele have a similar sperm quality but only in the clinical varicocele varicocelectomy are indicated.

Key Words: infertility, Spermatozoa; varicocele; sperm DNA damage, TUNEL, SCSA, SCD.

Introduction

One of the main causes of male infertility stems from a series of abnormally dilated veins in the pampiniform plexus commonly called in the routine clinical as varicocele. The presence and severity of this has been often associated with impaired spermatogenesis and poor sperm quality (WHO, 1992). Varicocele incidence has been estimated about 21% - 41% in the infertile male population (Saypol DC, 1981; Gorelick JI and Goldstein M, 1993). About the diagnosis, according to the Dubin system, a gradation of severity of the clinical varicocele can be established from grade 1 to 3 in the physical examination, while subclinical varicocele is commonly detected by scrotal Doppler ultrasonography (Lee et al., 2007; Pilatz et al., 2011). This distinction could have important implications because varicocele can be correctable of many forms and urologists must choose the method most suitable under the patient's clinical state to improve fertility (Diegidio et al., 2011). This is not an easy task since a lack of evidence about subclinical varicocele effecting sperm parameters exists and there are many controversies regarding treatment of subclinical varicocele since some studies reported variable effects on postoperative sperm parameters (Will MA et al., 2011).

Otherwise, sperm DNA fragmentation (SDF) is considered a marker of sperm quality which has experienced a growing interest in the last years (Aitken and Koppers, 2011). Main mechanisms of damage in the sperm cell are nuclease activation in a like-apoptotic process and oxidative stress associated a defective nuclear protamination and immaturity (Aitken and de Iuliis, 2010; Sakkas and Alvarez, 2010). Increased percentages of sperm with DNA fragmentation in varicocele patients has been founded (Saleh et al., 2003; Talebi et al., 2008) and many reports have been showed that surgical treatment improves DNA damage in sperm from these patients (Zini et al., 2005 and 2010). But, there

is a lack of information about sperm DNA integrity in subclinical varicocele as well as conflicting results about effects of impact of vein repair are remained.

The main objective of this study was to characterize the grade of sperm DNA fragmentation using three different methodological approaches in four cohorts of infertile males diagnosed with clinical or subclinical varicocele that have received surgical treatment or have not yet been treated.

Materials and methods

Subjects and Sample Selection

The study included a total of 60 infertile males with varicocele who were classified in four different cohorts: The first cohort included 15 males with non treated grade 1 clinical varicocele (Dubin grading system) (CV); the second group included 16 males with subclinical varicocele diagnosed by scrotal Doppler ultrasonography (ScV); the third cohort included 19 patients with treated clinical varicocele (T-VC) and 10 with treated subclinical varicocele (T-ScV) after 6-12 months the varicocelectomy were performed (Bunzt method).

Semen samples were obtained by masturbation after three days of sexual abstinence. Written, informed consent was given by all patients, and the study was approved by the Institutional Ethics Committee. Prior to cryopreservation, fresh ejaculate was allowed to liquefy, and spermogram were performed according WHO recommendation (WHO, 1999). Then, samples were mixed 1:1 with cryopreservation medium (14% glycerol, 30% egg yolk, 1.98% glucose and 1.72% of sodium citrate). After that, samples were aliquoted and incubated at -80 °C in an isopropanol bath overnight and

then plunged directly into liquid nitrogen until experiment was performed. For the analysis, all samples were thawed by immersion in a 37°C water bath for 30 seconds, washed three times with PBS buffer at room temperature and sperm concentration adjusted according to TUNEL, SCSA and SCD requirements for each case (Dominguez-Fandos et al., 2006; Evenson et al., 1999; Fernández et al., 2005).

Sperm DNA Fragmentation

TUNEL Assay

For terminal transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL), the *in situ* cell death detection kit, from Roche (Ref.11684795910, Roche Diagnostic GmbH; Penzberg, Germany), was used as previously described (Domínguez-Fandós et al., 2007). This assay quantifies, by flow cytometer or fluorescent microscopy, the incorporation of labeled deoxyuridine triphosphate (dUTP) at the sites of DNA breaks in a reaction catalyzed by the enzyme deoxynucleotidyl transferase enzyme. Semen samples from the patient and three fertile and chromosomally normal donors were washed twice in PBS and the concentration was adjusted to 20×10^6 cells/mL. Two-hundred microliters of this sperm suspension were fixed an equal volume of 4% (w/v) paraformaldehyde for 1 hour at room temperature and then washed in PBS supplemented with 1% (v/v) bovine serum albumin (BSA; Sigma Chemicals). Sperm cells were permeabilized using 0.1% (v/v) Triton X-100 in 0.1% (w/v) sodium citrate for 2 minutes in ice and then washed twice in PBS supplemented with 1% BSA. The pellet was incubated in 50 μ L of a mix containing 45 μ L of the label solution plus 5 μ L of the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme for 1 hour at 37°C in the dark. The sample was then washed twice using 1% BSA in PBS. The negative control

was incubated without the TdT enzyme and the positive control was prepared before the labeling reaction with an additional treatment with DNase I (Roche Diagnostic GmbH; Penzberg, Germany), 100 IU, for 10 minutes at 37°C.

In order to perform flow cytometry analysis, the final pellet from the sperm sample was resuspended in a final volume of 1mL PBS. Green fluorescence (TUNEL-positive cells) was measured using a 530nm \pm 30nm band-pass filter. A total of 10,000 events were measured at a flow rate of 200-300 cells/s on a flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, NJ, USA). Data were processed by CELLQUEST analysis software (Becton Dickinson).

SCD test

For the Sperm Chromatin Dispersion test (SCDt), the Halosperm kit was used (Chromacell SL; Madrid, Spain). The SCD test is based on the principle that sperm with fragmented DNA fails to produce the characteristic halo of dispersed DNA loops that is observed in non-fragmented DNA sperm (Fernández et al., 2005). The semen samples from the patient and from three fertile and chromosomally normal donors were washed twice in PBS and the concentration was adjusted to 20×10^6 cells/mL. Low-melting-point agarose was melted in a water bath at 90°C-100°C for 5 min and placed in water at 37°C for 5 min to allow for equilibration. Then, 60 μ L of the semen sample were mixed with agarose and 20 μ L of the semen-agarose mixture were pipetted onto an agarose-coated slide, covered with a coverslip and left at 4°C for 5 min. The coverslip was gently removed and immersed in an acid solution for 7 min, washed for 5 min with distilled water and incubated in 10 ml of the lysing solution for 25 min. After washing, the slides were dehydrated in 70%, 90% and 100% ethanol for 2 min each and then air-dried. Slides were stained for fluorescence

microscopy using DAPI (2 µg/mL) (Roche Diagnostics; Barcelona, Spain) in Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame, CA). The positive control was prepared with an additional treatment with DNase I (Roche Diagnostic GmbH; Penzberg, Germany), 100 IU, for 10 minutes at 37°C. For this study, 300 spermatozoa were scored and the percentage of sperm with fragmented DNA is referred to as sperm DNA fragmentation (SDF).

Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

SCSA protocol has been described elsewhere by Evenson et al. (1999). Briefly, an aliquot of the thawed semen sample was diluted to a concentration of 2×10^6 sperm/mL in TNE buffer (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris and 1 mM EDTA, pH 7.4) to a total of 200 µL. Thereafter, 400 µL of acid detergent solution (0.08 M HCl, 0.15 M NaCl, 0.1 % Triton X-100, pH 1.2) were added. After 30 seconds, the sperm was stained by adding acridine orange (AO) staining solution containing 6 µg AO (Invitrogen; Molecular Probes; Eugene, Oregon, USA) per mL buffer (0.037 M citric acid, 0.126 M Na₂ HPO₄, 1.1 mM EDTA disodium, 0.15 M NaCl, pH 6.0). After 3 min of staining, a total of 5,000 sperm cells were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson; NJ, USA). The percent of sperm with DNA fragmentation was determined between the main sperm population, which has a normal level of red fluorescence (normal DNA integrity), and those with increased red fluorescence, corresponding to fragmented DNA.

Statistical Analysis

Data analysis was performed using the Statistics Package for the Social Sciences software, version 15 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Values were compared using the Kruskal-wallis and the U Mann-Whitney test. Correlations were studied using the

Pearson/spearman test. The level of significance was established at 95% of the confidence interval to be considered as statistically significant.

Results

Seminogram Analysis

Table 1 shows seminogram values expressed as average \pm standard deviation obtained in the four cohorts of patients. No statistical differences were observed between clinical and subclinical varicocele groups for any of the parameters analyzed. Statistical differences were mainly observed among subclinical varicocele after surgical treatment when compared to other groups. Specially, for sperm concentration/ml and total sperm concentration, the subclinical varicocele after treatment group produces the lowest values ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). Moreover, the type b mobility was also diminished versus the clinical varicocele after treatment group ($p < 0.05$) while type d mobility were statistical increased compared with treated clinical varicocele group ($p < 0.05$).

Multiple Determination of Sperm DNA Fragmentation

Table 2 shows sperm DNA fragmentation values expressed as average \pm standard deviation obtained in the four cohorts of patients and figure 1 shows graphic representation of data. No statistical differences were observed between clinical and subclinical varicocele groups for sperm DNA damage regardless of method of analysis used. After surgical treatment, SDF values were statistically improved by SCSA ($p < 0.05$), SCD ($p < 0.05$) but not for TUNEL assay, although a trend towards significance was observed ($p = 0.096$). No benefit was found for any of the methods to determine SDF after surgical treatment in

patients with subclinical varicocele ($p>0.05$). Using SCD a statistical difference was observed between clinical and subclinical varicocele groups after surgical treatment, SDF were substantially more increased in the varicocele subclinical group ($p<0.05$).

HDS and DDS Analysis

Results for these variables are exposed in table 2 and represented in figure 2. Not statistically differences were observed for both DDS and HDS among the groups ($p>0.05$).

Correlation Analysis

Analysis showed a good correlation among methods to determine sperm DNA damage. Values were $r=0.703$ ($p=0.000$) for TUNEL vs. SCSA; $r=0.568$ ($p=0.000$) for TUNEL vs. SCD; $r=0.662$ ($p=0.000$) for SCSA vs. SCD.

No correlation among seminograma parameters and multiple SDF variables obtained from the different methodologies were found.

Discussion

Objetively, three were the main objectives of this work: i) to gain information about different methods to determine sperm DNA damage in a collection of astenoteratozospemic (ATZ) with varicocele patients; ii) to determine sperm quality in both infertile patients with clinical and subclinical varicocele and iii) to determine sperm quality that results after surgical treatment patient cohorts of clinical and subclinical varicocele.

Currently, there is a debate about whether the various methods available to determine the degree of DNA fragmentation offer the same guarantees of sensitivity and

specificity (Choham y col., 2006; Aitken y col; 2009). Many efforts are being conducted to the optimization of these methods which usually give an estimate of the percentage of sperm with fragmented DNA, although recently, efforts are also being directed to determine whether DNA damage is single-stranded or double-stranded (Ribas y col., 2012; Enciso y col., 2010). Of special interest is the demonstration that apoptotic bodies can affect the results of TUNEL assay. These structures represent a confounding factor in studies on semen samples because the cytometer cannot distinguish these from the sperm because exhibit similar forward Scatter/Side scatter properties (Marchiani et al., 2007). The presence of these apoptotic bodies is especially common in patients with astenoteratozoospermia such as, for example, varicocele patients. In this work, the presence of these apoptotic bodies were not considered when TUNEL assay were performed and probably, differences observed among methods could be related with this cause. In a previously published work of our group, we founded an excellent correlation among this three methods on a serial of semen samples with normal seminal parameters (García-Peiro et al.,2011). One conclusion from this observation is that in patients with ATZ with varicocele, a more representative population of apoptotic bodies exists. In consequence, apoptotic bodies (Marchiani y col., 2007) must be taken into account when analysis of SDF in varicocele patients using cytometric assays as TUNEL or SCSA. In fact, a better correlation values between these two cytometric methodologies than with SCD, have been found.

The results of the present study strongly indicate that infertile patients with a diagnosis of subclinical varicocele (as categorized by ultrasound) have a similar sperm quality than infertile patients with clinical varicocele.

The other issue of interest is the putative benefial effect of varicocelectomy in these patients. The results obtained in this investigation, suggest that surgical treatment applied in

this case, the Bunzt method varicocelelectomy, did not improve sperm DNA integrity and also produced an adverse effect on seminal parameters (table 1). However we are aware that strong discordances opinions on diagnosis and effects of surgical treatment of varicocele have been heard for many years. Often, because the distinction between clinical and subclinical varicocele studies have not been considered. About that, in this report, not differences about seminograma parameters and multiple sperm DNA fragmentation analysis had been found between clinical and subclinical varicocele suggesting that infertile patients with a diagnosis of varicocele, regardless of whether clinical or subclinical, could have a similar difficult to get pregnancy. Moreover, and to strengthen this observation, not differences for DDS between them have been also found. This is especially interesting since Enciso et al., reported that this particular sperm subpopulation, which is characterized by an intensive pattern of damaged DNA, is a specifically sperm subpopulation highly represented in patients with varicocele but not in others infertile males. From the etiologic viewpoint, this could mean that both clinical and subclinical varicocele present a similar negative impact on the spermatogenesis. Subsequently, both types varicocele would require the same treatment, but results obtained in this work about sperm quality after varicocelelectomy in subclinical varicocele are showing negative consequences. Then, on the light of these results, varicocelelectomy should be contraindicated in patients with subclinical varicocele. The possibility exists that this effect could be different depending on the surgeon's ability/inability to distinguish the affected veins. Consequently, the microsurgical varicocelelectomy method could be a more efficient method to treat these patients that needs to be tested and in parallel the consequences on sperm quality. In fact, recent studies provide data on the benefits of microsurgery on sperm quality in this type of patients (Paul Diegidio et al., 2011) and DNA integrity (Zini et al., 2005 and 2010).

In conclusion, using a multiple sperm DNA determination methods seems to confirm that clinical and subclinical varicocele have similar and negative effects on sperm DNA quality, but surgical treatment must be different for subclinical patients.

Bibliography

World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. Fertil Steril. 1992 Jun;57(6):1289-93.

Gorelick JJ, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. Fertil Steril. 1993 Mar;59(3):613-6.

Will MA, Swain J, Fode M, Sonksen J, Christman GM, Ohl D. The great debate: varicocele treatment and impact on fertility. Fertil Steril. 2011 Mar 1;95(3):841-52. Epub 2011 Jan 26.

Pilatz A, Altinkilic B, Köhler E, Marconi M, Weidner W. Color Doppler ultrasound imaging in varicoceles: is the venous diameter sufficient for predicting clinical and subclinical varicocele? World J Urol. 2011 May 24.

Lee J, Binsaleh S, Lo K, Jarvi K. Varicoceles: the diagnostic dilemma. J Androl. 2008 Mar-Apr;29(2):143-6. Epub 2007 Dec 12. Review.

Diegidio P, Jhaveri JK, Ghannam S, Pinkhasov R, Shabsigh R, Fisch H. Review of current varicocelectomy techniques and their outcomes. BJU Int. 2011 Mar 24. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09959.x. [Epub ahead of print]

Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. Asian J Androl. 2011 Jan;13(1):36-42. Epub 2010 Aug 30. Review.

Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. Mol Hum Reprod. 2010 Jan;16(1):3-13. Epub 2009 Jul 31. Review.

Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010 Mar 1;93(4):1027-36. Epub 2010 Jan 18.

Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 2003 Dec;80(6):1431-6.

Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasemzadeh J Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia*. 2008 Aug;40(4):245-51.

Zini A, Blumenfeld A, Libman J, Willis J. Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod*. 2005 Apr;20(4):1018-21. Epub 2004 Dec 17

Zini A, Azhar R, Baazeem A, Gabriel MS. Effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm chromatin and DNA integrity: a prospective trial. *Int J Androl*. 2011 Feb;34(1):14-9. doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.01048.x.

	Clinical varicocele (n=15)	Clinical varicocele after surgical treatment (n=19)	Subclinical varicocele (n=16)	Subclinical varicocele after surgical treatment (n=10)
Sperm/mL	140.25±110.31	109.20±59.20	140.24±134.06	39.23±24.78 ^a
Total sperm	478.05±376.82	413.2±258.00	364.06±272.01	165,44±149.95 ^b
Movility a (%)	17.46±9.33	18.21±9.58	14.93±10.58	16.00±8.32
Movility b (%)	16.93±9.37	22.78±9.81	18.5±10.05	14.20±4.93 ^{c,d}
Movility a+b (%)	34.4±16.50	41.00±15.59	33.43±17.92	30.30±10.89 ^e
Movility d (%)	44.40±21.61	38.21±17.10	45.68±24.90	53.414.46 ^e
Vitality (%)	64.2±15.70	69.36±16.95	57.62±24.34	58,00±20.39
Normal forms (%)	7.53±6.88	6.63±4.91	6.25±4.69	4.80±5.28

Note: Values are expressed as mean ± SD. Multiple Comparisons were performed using the U-Mann-Whitney test.

^a Statistical differences versus all groups; $P < 0.01$; K-W test

^b Statistical differences versus all groups; $P < 0.05$; K-W test

^c Statistical differences versus clinical varicocele after surgical treatment; $P < 0.05$

^d p value for the comparison between clinical and subclinical varicocele after surgical treatment: $P = 0.071$

^e p value for the comparison between clinical varicocele after surgical treatment and subclinical varicocele after surgical treatment: $P = 0.069$

Table 2. SDF, HDS and DDS outcomes.				
	Clinical varicocele (n=15)	Clinical varicocele after surgical treatment (n=19)	Subclinical varicocele (n=16)	Subclinical varicocele after surgical treatment (n=10)
TUNEL (%)	32.51±14.14	24.67±14.14 ^c	34.90±14.40	30.14±12.65
SCSA (%)	25.38±11.03	17.37±8.00 ^{a,d}	26.87±15.49	30.41±19.46
SCD (%)	32.75±10.53	23.92±8.40 ^{a,b}	39.25±15.66	35.20±14.52
HDS-SCSA (%)	15.83±8.69	12.65±6.01	13.22±7.38	15.56±8.06
DDS-SCD (%)	16.33±6.14	13.84±4.71	20.28±7.44	17.4±5.75

Note: Values are expressed as mean ± SD. Multiple Comparisons were performed using the U-Mann-Whitney test.

^a Statistical differences versus clinical varicocele; $P < 0.05$

^b Statistical differences versus subclinical varicocele after surgical treatment; $P < 0.05$

^c p value for the comparison between clinical varicocele and clinical varicocele after surgical treatment: $P = 0.096$

^d p value for the comparison between clinical and subclinical varicocele after surgical treatment: $P = 0.069$

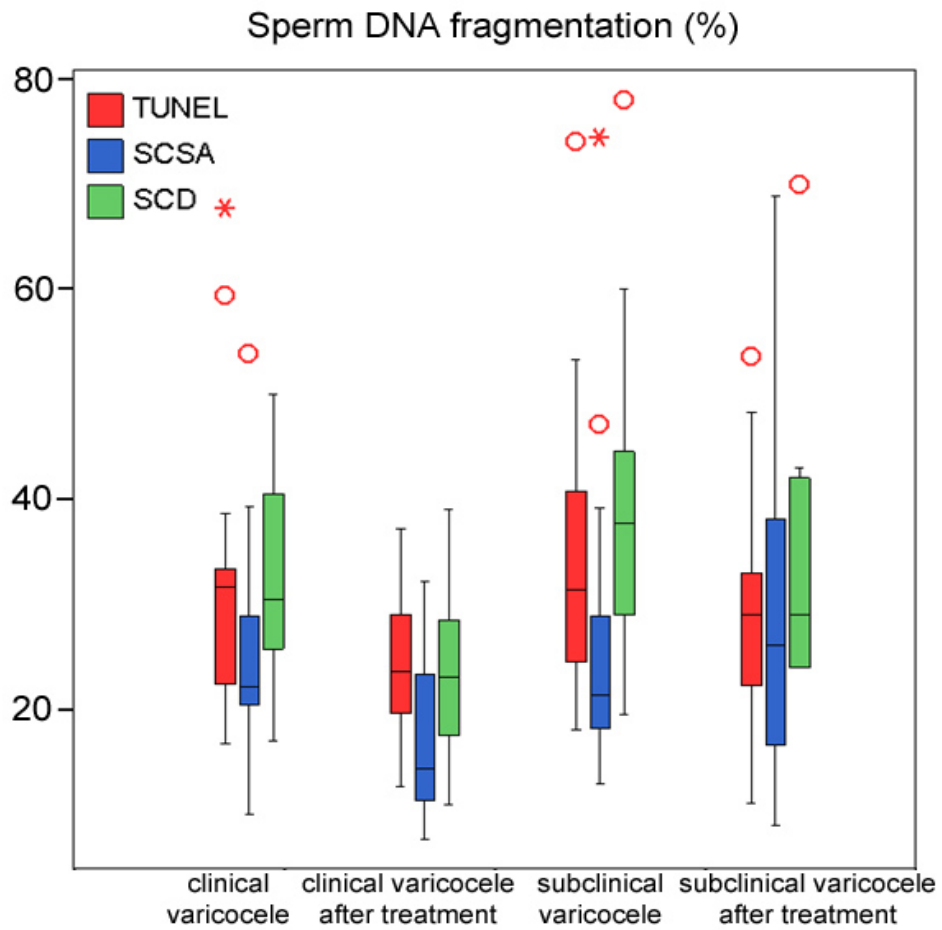


Figure 1. Box-and-whisker plot shows values of sperm DNA fragmentation expressed as percentage using TUNEL, SCSA and SCD methods for the different groups of patients analyzed.

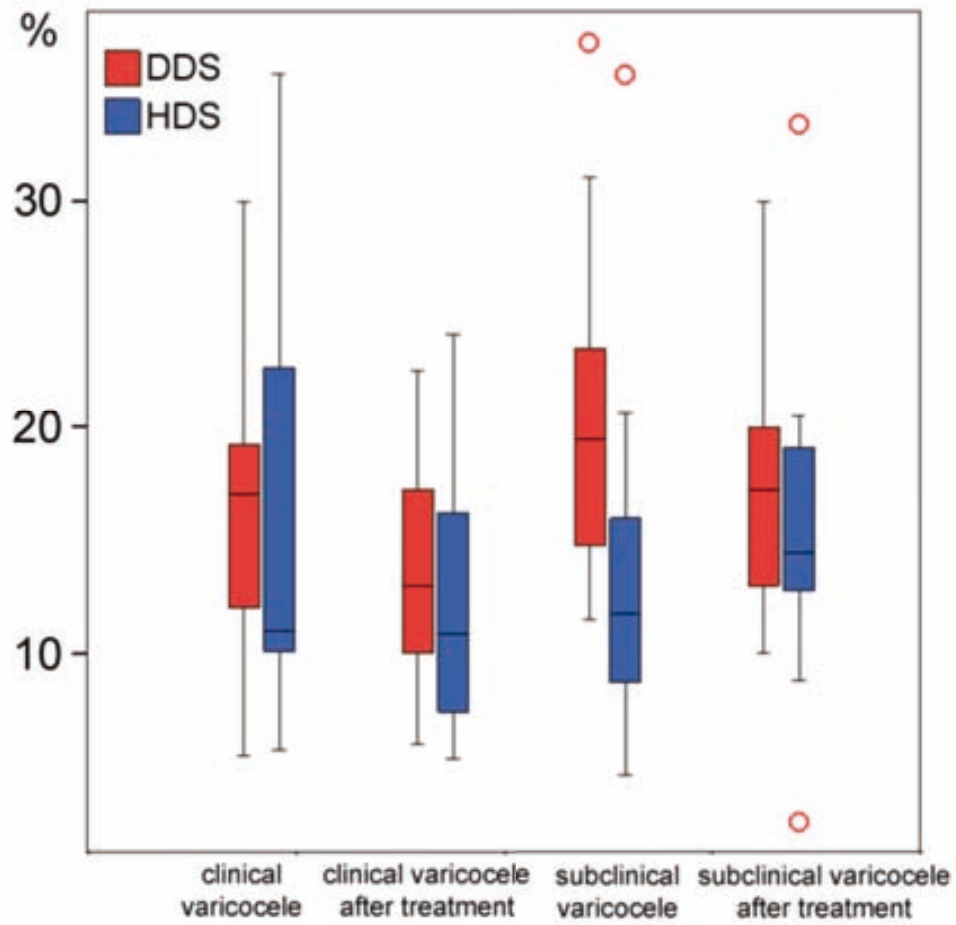


Figure 2. Box-and-whisker plot shows values of DDS and HDS expressed as percentage for the different groups of patients analyzed.

5. DISCUSIÓN

5.1 Valoración de las técnicas utilizadas

En el presente trabajo, hemos conseguido determinar la fragmentación del ADN espermático aplicando tres métodos actualmente descritos, TUNEL, SCSA y SCD (Barroso y col., 2000; Evenson y col., 1999; Fernández y col., 2005). El análisis de la fragmentación se ha realizado en muestras de individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas con seminograma normal, en una muestra de un individuo infértil 46XY 9qh+++ y en muestras de pacientes con varicocele y seminograma alterado (astenoteratozoospermia) (Objetivo 1, Artículos 2, 3, 5 y 6). Nuestros resultados demuestran la existencia de una muy buena correlación entre los métodos utilizados, los cuales determinan la fragmentación del ADN espermático con un alto grado de confianza (Tabla I).

Tabla I. Correlación entre métodos de fragmentación del ADN espermático.		
	Seminogramas Normales	Varicocele (ATZ)
TUNEL vs. SCSA	r= 0.90 p<0.01	r= 0.803 p< 0.01
TUNEL vs. SCD	r= 0.91 p<0.01	r= 0.629 p< 0.01
SCSA vs. SCD	r= 0.91 p< 0.01	r= 0.708 p< 0.01

La **Tabla I** muestra los valores de correlación obtenidos para un grupo de muestras con diagnóstico de seminograma normal y otro grupo de pacientes con varicocele y astenoteratozoospermia. Mientras que en los seminogramas normales la correlación entre todos los métodos es excelente, en pacientes con ATZ la correlación obtenida entre los métodos citométricos es mejor que la que se obtiene entre un método citométrico y un método no citométrico.

En la actualidad existe un intenso debate sobre la conveniencia de utilizar una metodología u otra para determinar el grado de fragmentación del ADN espermático (Chohan y col., 2006). Tras haber analizado múltiples pacientes con distintas etiologías asociadas con la infertilidad nuestra apreciación general en relación a las metodologías utilizadas es que todas determinan la fragmentación del ADN con un alto grado de correlación. No obstante, nuestros resultados también evidencian la existencia de

diferencias que pueden estar relacionadas tanto con el estado inicial de la muestra como con las características fisiopatológicas del grupo de pacientes del que procede. Otro factor que se debe tener en cuenta es el hipotético efecto que la criopreservación puede ejercer en los resultados. Algunos estudios previos apuntan que la criopreservación y consiguiente descongelación de las muestras pueden condicionar los resultados en las muestras de peor calidad (Fortunato y col., 2012), aunque otros autores señalan que este hecho parece ser moderadamente uniforme (Brugnon y col., 2006; de Paula y col., 2006). En nuestra opinión, la determinación del ADN como marcador de calidad espermática con aplicación en el diagnóstico de la infertilidad masculina, se debería hacer preferiblemente en eyaculados lo más recientes posible para que la muestra se encuentre en un estado comparable al que está en el momento del coito. Por motivos prácticos, dado que las muestras se recogen en un laboratorio distinto en el que se realizan los análisis y los tiempos de recepción y transporte de los eyaculados pueden ser muy variables, la totalidad de este estudio se ha realizado en muestras de semen criopreservadas. Para dar mayor rigor a los resultados así como optimizar el estudio, se ha optado por usar diferentes metodologías.

Conforme a los resultados obtenidos, no parece que existan diferencias entre las diferentes técnicas. Este hecho concuerda con los resultados previos de Chohan y col., 2006 en el que las mismas metodologías ofrecieron un alto grado de correlación. Sin embargo, los resultados obtenidos no son idénticos y existen variaciones entre individuos que se acentúan especialmente en aquellas muestras que presentan un mayor deterioro del ADN espermático. Esta observación podría relacionarse con la presencia elevada de espermatozoides inmaduros que presentan características fenotípicas de espermátida, en las que el proceso de reemplazo de histonas por protaminas así como la maduración final de la

cromatina nuclear (formación de puentes disulfuro) no se ha completado o se ha visto interrumpido. Esto podría alterar los resultados obtenidos con metodologías que se basan en la estructura de la cromatina espermática, como es el SCSA.

En relación a las diferencias observadas que puedan estar condicionadas por las características fisiopatológicas del grupo de pacientes del que procede, se ha observado una disminución en los valores de correlación obtenidos entre los métodos citométricos y no citométricos en pacientes con varicocele. Esta observación puede estar relacionada con algunos aspectos técnicos de cada una de las metodologías utilizadas en este estudio. Tanto el ensayo TUNEL (Barroso y col., 2000) como el SCSA (Evenson y col., 1999), requieren de un citómetro de flujo para poder establecer la proporción de espermatozoides con el ADN fragmentado. El citómetro de flujo, que contabiliza células de una manera efectiva y muy rápida, puede llegar en segundos a contabilizar 10.000 o más espermatozoides. Esto supone un robustecimiento substancial en las estimaciones estadísticas posteriores. Sin embargo, existen algunos inconvenientes, y en relación con la fragmentación del ADN espermático, el más representativo tiene que ver con la presencia de los cuerpos apoptóticos M540 (Marchiani y col., 2007).

Los cuerpos apoptóticos M540 son estructuras celulares residuales que se producen como consecuencia de la apoptosis celular y se visualizan por tinción con Merodicina 540, un antibiótico con propiedades fluorescentes que se intercala en el ADN. La presencia de cuerpos apoptóticos en el eyaculado puede distorsionar los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, ya que se confunden con los espermatozoides al presentar características de tamaño (Side Scatter, SSC) y complejidad de membrana similares (Forward Scatter, FSC).

La presencia de estos cuerpos apoptóticos no ha sido comprobada ni en individuos portadores de reorganización cromosómicas ni en pacientes diagnosticados con varicocele. No obstante, Marchiani y col., (2007), en un intento de caracterizar la presencia de estas estructuras en el eyaculado de diferentes individuos, mostró que éstas están presentes en mayor o menor cantidad en todos los eyaculados. La presencia de cuerpos apoptóticos en individuos oligoastenoteratozoospermicos y astenoteratozoospermicos es muy elevada, mientras que en sujetos normozoospermicos, astenozoospermicos y teratozoospermicos estas estructuras se encuentran en proporciones muy bajas. De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de Marchiani y col., (2007) dado que los pacientes portadores de reorganizaciones cromosómicas analizados en nuestro estudio son normozoospermicos, se esperaría encontrar una mejor correlación entre las tres metodologías en estas muestras que en las muestras de los pacientes con varicocele (etiologicamente clasificados como astenoteratozoospermicos y, teóricamente, con una mayor presencia de cuerpos apoptóticos). Efectivamente, la correlación entre métodos fue del 90% en el conjunto de pacientes portadores de reorganizaciones cromosómicas. En cambio, en el estudio de varicocele el grado de correlación bajó al 60% y al 70% en función de si éste se establecía entre métodos basados en análisis citométrico o no. Cabe destacar que el valor de correlación más bajo se estableció entre el método SCD (no citométrico) y el método TUNEL (citométrico) y el valor más alto se obtuvo entre los métodos TUNEL y SCSA (ambos citométricos). Estos valores sugieren la existencia de un factor en estos pacientes que interfiere en los resultados. Este factor podría ser la presencia de cuerpos apoptóticos. Por ello, proponemos que la elección del método de análisis de la fragmentación del ADN espermático tenga en cuenta las características del seminograma del paciente. Esto constituye una ventaja para la metodología SCD, ya que en esta tecnología se utiliza el

microscopio de fluorescencia para el análisis y ello permite distinguir cuerpos apoptóticos de espermatozoides.

Por último, desde una perspectiva práctica del funcionamiento rutinario en el laboratorio andrológico, podemos realizar una valoración diferente de las técnicas utilizadas. Si atendemos a criterios relativos a la complejidad metodológica, la necesidad de personal técnico especializado, las barreras legales (protección por patente, por ejemplo), el tiempo y los costes de análisis y el equipo necesario, creemos que el método SCD es el más adecuado: no requiere equipos sofisticados, es rápido y fácil de interpretar. La técnica del SCSA, aunque es una técnica muy rápida y de bajo coste, requiere de un citómetro de flujo para ser llevada a cabo. Además, dado que este método se encuentra protegido por patente, necesita una licencia para su uso fuera del ámbito de la investigación. En cuanto a la técnica de TUNEL, su evaluación mediante microscopia de fluorescencia aparece, en principio, como una ventaja. No obstante, esta evaluación directa requiere una elevada experiencia por parte del evaluador que realiza el análisis, puesto que la señal observada comprende un abanico de intensidades que hace difícil decidir el recuento. En caso de utilizar la citometría de flujo para la evaluación de la técnica de TUNEL, además del requerimiento del aparato se debe tener muy en cuenta el efecto interferente de los cuerpos apoptóticos y aunque es posible ajustar las condiciones de análisis del citómetro esto requiere de personal muy especializado.

5.2 Valoración de otras subpoblaciones espermáticas

Los resultados obtenidos muestran que las subpoblaciones espermáticas HDS (High DNA stainability) y DDS (Dna Degraded Sperm) son diferentes y además se encuentran

incrementadas en los pacientes con varicocele y portadores de reorganizaciones cromosómicas. Estos resultados indican que la determinación y cuantificación de estas subpoblaciones de espermatozoides podría utilizarse como marcador diagnóstico de estas dos patologías (Objetivo 2, Artículo 4).

En este trabajo, hemos determinado por primera vez el porcentaje de estas dos subpoblaciones, (HDS y DDS) así como la relación que existe entre ellas con el Objetivo de determinar su posible aplicabilidad diagnóstica. Aunque algunos estudios han asociado su presencia con la infertilidad (Evenson y col., 1999; Enciso y col., 2006; Zini y col., 2009), la relación entre las dos subpoblaciones de espermatozoides y su preponderancia en grupos clínicos específicos de hombres infértiles no han sido ampliamente investigados. Las metodologías SCSA y SCD, además de determinar el grado de fragmentación del ADN espermático, identifican este otro tipo de subpoblaciones espermáticas. Así, el SCSA puede determinar qué porcentaje de espermatozoides inmaduros (HDS) están presentes en una muestra concreta, mientras que el SCD reconoce un tipo de espermatozoide que exhibe un alto grado de fragmentación del ADN y pérdida de proteínas nucleares (DDS). Los resultados presentados en este trabajo demuestran que estas poblaciones se encuentran en mayor o menor proporción en todos los eyaculados independientemente de si son individuos fértiles o infértiles y que, además, un aumento significativo está asociado con la presencia de varicocele o reorganización cromosómica. Así lo confirman los resultados obtenidos en los que se observa un incremento significativo de estas subpoblaciones espermáticas en individuos portadores de reorganizaciones espermáticas y varicocele respecto a los valores observados en donantes fértiles y otros pacientes infértiles. Por otra parte, la ausencia de correlación entre ambas subpoblaciones no solo sugiere que las subpoblaciones HDS y DDS son espermatozoides con características diferentes sino que su

etiología se basa en mecanismos fisiopatológicos diferentes. Mientras que la subpoblación HDS parece ser el producto de espermatozoides inmaduros a nivel de compactación de la cromatina (Evenson y Wixon, 2006; Zini y col., 2009), la población DDS parece ser el producto de una rotura del ADN masiva de posible origen enzimático. Esta última posibilidad viene refrendada por los resultados obtenidos en tratamientos paralelos con peróxido de hidrógeno y enzimas nucleasas en condiciones de descondensación nuclear o no mediante el tratamiento con DTT. Con estas condiciones experimentales se obtiene un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides degradados por la actividad de enzimas nucleasas (resultados no mostrados, Artículo en preparación).

Por todo ello, creemos que la determinación de estas subpoblaciones espermáticas, especialmente la DDS, podría ser útil en la identificación de pacientes con varicoceles o reorganizaciones cromosómicas. Sugerimos que a los individuos que muestren porcentajes incrementados de estas subpoblaciones se les realice el cariotipo somático y una ecografía testicular para la confirmación del diagnóstico de varicocele.

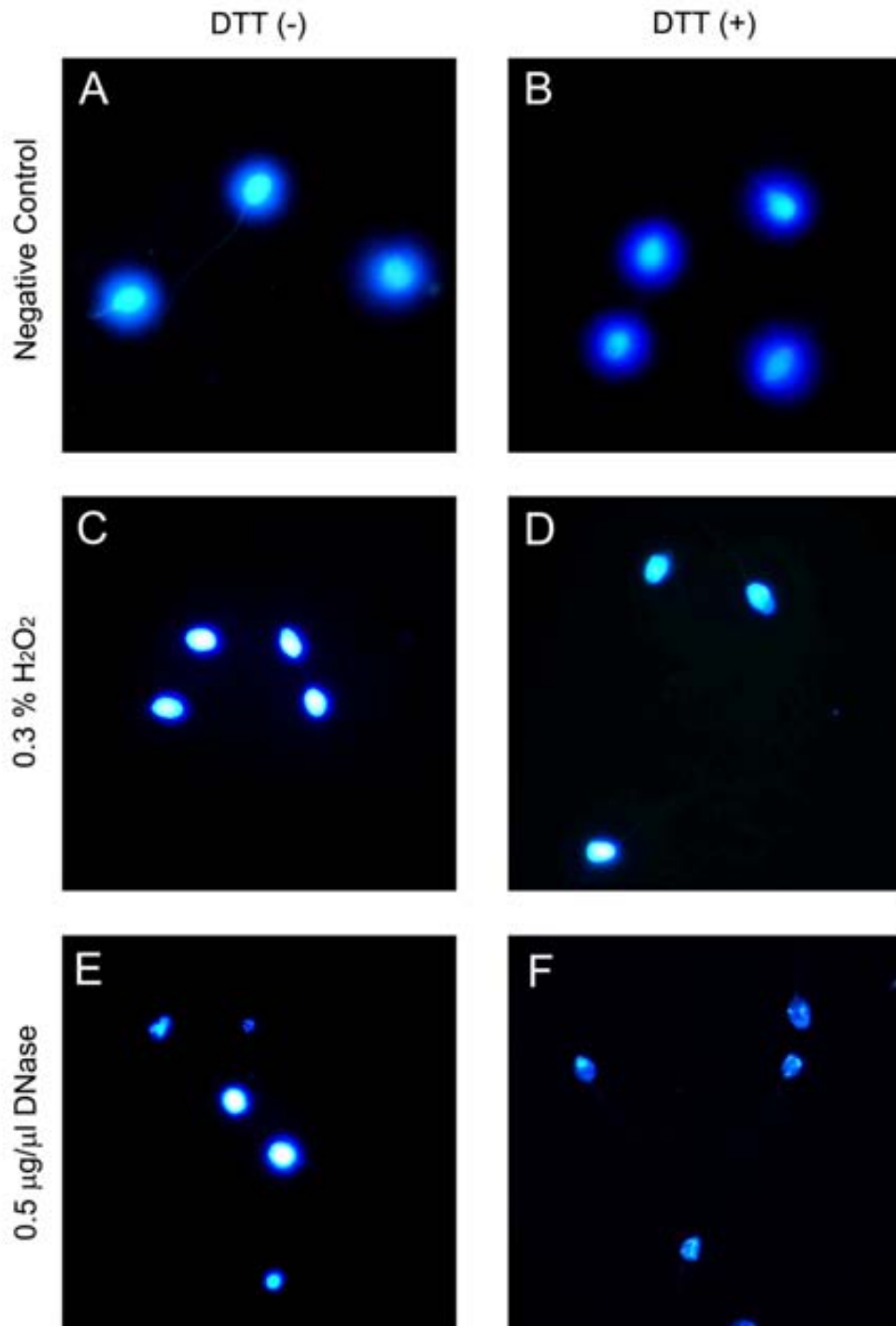


Figura 13. Efecto sobre la integridad del ADN del tratamiento con peróxido de oxígeno y nucleasas en función del estado de compactación nuclear mediante DTT. La descompactación nuclear no afecta a la integridad del ADN (A y B). El peróxido de hidrógeno fragmenta el ADn independientemente del estado de compactación nuclear(C y D) . Producción de formas DDS mediante nucleasas en nucleos no descondensados (E) y nucleos descondensados (F).

5.3 Determinación de la fragmentación en los grupos de pacientes estudiados

En este trabajo se ha conseguido determinar el grado de fragmentación del ADN en (n=11) individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas (Objetivo 1a, Artículo 3) y en un caso poco frecuente de un individuo infértil que presentaba un polimorfismo extremo de heterocromatina de la región pericentromérica del cromosoma 9 (9qh+++)
(Objetivo 1b, Artículo 2). Por otra parte se ha determinado la fragmentación del ADN espermático en diferentes grupos de pacientes con varicocele en función de si habían recibido o no tratamiento quirúrgico (Objetivo 1c, Artículo 6)

5.3.1. Portadores de reorganizaciones cromosómicas

Nuestros resultados demuestran que los individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas presentan unos niveles estadísticamente incrementados de espermatozoides con fragmentación del ADN. También se trata del grupo de pacientes más variable en cuanto a fragmentación del ADN, por lo que es posible que el grado de fragmentación pudiese depender del tipo específico de reorganización cromosómica.

Los estudios de la fragmentación del ADN espermático han evidenciado que los individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas, además de tener un mayor riesgo de producir gametos desequilibrados, tienen incrementada de forma significativa la fragmentación del ADN espermático. Por ello, algunos autores sugieren que ser portador de una translocación supone presentar una mayor fragmentación del ADN espermático (Perrin y col., 2009). Sin embargo, en base a los valores de desviación estándar obtenidos para la fragmentación del ADN espermático, nuestros resultados demuestran que este grupo de

pacientes se caracteriza por presentar una heterogeneidad significativa. Así, el 54,5% de las muestras analizadas presentaron porcentajes de fragmentación a t0 similares a los obtenidos en el grupo de controles fértiles mientras que el 45,5% superaba los niveles de normalidad (Artículo 3). Estos datos son comparables con los resultados publicados por Perrin y col.,(2009), en el que hasta el 40% de las muestras presentaron valores similares con respecto a su propio grupo control. Perrin y col., (2009) concluyen que el índice de fragmentación del ADN depende únicamente de la presencia de una anomalía cromosómica estructural y en consecuencia, una anomalía cromosómica estructural se asocia e incluso predice porcentajes incrementados de espermatozoides con fragmentación del ADN. Pero nuestros resultados evidencian que si bien desde un punto de vista estadístico los individuos con reorganizaciones cromosómicas presentan porcentajes incrementados de espermatozoides con el ADN fragmentado, la variabilidad observada en este grupo de pacientes es muy significativa, un 54,5 % presentaban valores de fragmentación del ADN normales por lo que ser portador de una reorganización cromosómica no implica necesariamente presencia de valores de fragmentación del ADN anormales.

La variabilidad en la fragmentación del ADN observada en estos individuos podría explicarse en base a que cada tipo de reorganización cromosómica podría interferir en mayor o menor grado en la compleja y específica arquitectura nuclear espermática. Este hecho podría comportar la producción de espermatozoides inmaduros a nivel de compactación de la cromatina y causar una mayor predisposición o susceptibilidad a fragmentación del ADN frente a agentes externos estresantes (enzimas nucleasas o especies reactivas de oxígeno). La organización del ADN nuclear espermático no es un proceso trivial. En este sentido Mudrak y col.,(2006) utilizando sondas específicas para los cromosomas 1, 2 y 5 determinaron la existencia de dominios cromosómicos específicos en

el núcleo espermático. Dichos dominios son consistentes con la existencia de niveles jerárquicos en la estructura de la cromatina espermática. Otros estudios aportan evidencias sobre la existencia de una arquitectura nuclear del espermatozoide bien definida y organizada (Foster y col., 2005). Existen también otro tipo de dominios cromosómicos relacionados con regiones lábiles alcalinas que forman regiones estables muy bien conservadas en individuos de la misma especie (McPherson y Longo, 1992; Marcon y Boissonneault, 2004; Cortés-Gutiérrez y col., 2008). Ante un escenario de organización y complejidad estructural elevada de la cromatina espermática, la presencia de una reorganización cromosómica interferiría en el proceso de compactación del ADN nuclear durante la espermiogénesis. El grado de afectación sería variable y dependería del tipo y características de los cromosomas implicados en la reorganización así como la localización de los mismos en el núcleo espermático (García-Peiró y col., 2011c). En este sentido, utilizando la microscopía electrónica, otros estudios han observado que un elevado porcentaje de espermatozoides presentan defectos estructurales en individuos portadores de translocaciones Robertsonianas (Brugnon y col., 2010).

Como la variabilidad obtenida en la fragmentación del ADN espermático puede depender del tipo concreto de reorganización que presenta cada individuo, se recomienda realizar un estudio de fragmentación del ADN en estos pacientes con el fin de determinar el potencial de fertilidad particular.

5.3.1.1 El caso del 9qh+++

Los resultados de fragmentación del ADN espermático obtenidos en este paciente, 87% y 77% con SCD y TUNEL respectivamente, mostraron un aumento estadísticamente

significativo en comparación con los resultados obtenidos en el grupo de controles fértiles, 10% y 15%, y también con los obtenidos en otros grupos de pacientes infértiles (individuos con varicocele 31% de promedio o pacientes portadores de reorganizaciones cromosómicas 24%).

En este caso, la apoptosis durante el proceso de espermatogénesis podría ser una causa de fragmentación del ADN. Esto explicaría también el bajo número de espermatozoides presentes en el eyaculado. La activación de la apoptosis se produciría a consecuencia de la formación de un lazo de heterocromatina pericentromérica en uno de los cromosomas homólogos del 9, cuyo excesivo tamaño podría desbordar en tiempo y extensión los mecanismos de ajuste postsináptico (Solari y col., 1999). La persistencia de la asinapsis durante todo el estadio de paquiteno implicaría una activación de los mecanismos apoptóticos en el espermatocito reduciendo el número de espermatozoides eyaculados (Odorisio et., 1998). Otros mecanismos que justifiquen el alto grado de fragmentación del ADN espermático pueden producirse en fases posteriores de la espermatogénesis. Durante la espermiogénesis, se produce el recambio de histonas por protaminas, de manera que los cromosomas se compactan y organizan en dominios específicos hasta alcanzar una compleja y bien organizada estructura cromatínica nuclear espermática (Mudrak y col., 2005; Foster y col., 2005). La presencia de una región polimórfica tan grande de heterocromatina pericentromérica podría comportar un impedimento estructural de forma similar a la que se ha propuesto en los individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas. De esta manera ello podría afectar a la arquitectura normal del núcleo espermático lo que conduciría a una situación de vulnerabilidad del ADN ante agentes que pueden dañarlo como son las especies reactivas de oxígeno o enzimas nucleasas.

5.3.2 Varicocele

Nuestros resultados constituyen la primera evidencia de que los pacientes infértiles diagnosticados de varicocele clínico o subclínico presentan porcentajes incrementados de fragmentación del ADN espermático similares (Tabla X). Además, demuestran que el tratamiento quirúrgico no debería recomendarse a los pacientes con varicocele subclínico, dado que éste aumenta la fragmentación y empeora los parámetros seminales (Objetivo 1c, Artículos 1 y 6).

Tabla II. Resultados de fragmentación del ADN espermático en pacientes con varicocele.		
	Varicocele Clínico	Varicocele Subclínico
TUNEL (%)	32.51±14.14	34.90±14.40
SCSA (%)	25.38±11.03	26.87±15.49
SCD (%)	32.75±10.53	39.25±15.66

Actualmente resulta complicado valorar el grado de afectación que presenta el varicocele en relación a la capacidad fértil del individuo (Will y col., 2011). Las causas hay que buscarlas, en primer lugar, en una etiología diversa en la que confluyen varios aspectos fisiopatológicos (Zini y col., 1997; Chehval M y Purcell MH, 1992), así como en la subjetividad del especialista médico a la hora de realizar el diagnóstico y precisar el grado de afectación en cada caso (Lee y col., 2007). En segundo lugar, no existe aún un consenso sobre la eficacia de los distintos métodos o aproximaciones quirúrgicas para el tratamiento (Zini y col., 2011). Si añadimos el hecho de que el 15% de la población fértil tiene

varicocele, se entiende que el especialista proceda con reservas a la hora de dictaminar su diagnóstico y de decidir cuál es la mejor opción terapéutica para el paciente. Así pues, excepto en casos muy evidentes, donde además el varicocele cursa con dolor y otras molestias, resulta difícil determinar hasta qué punto el testículo y su principal función, la espermatogénesis, se está viendo afectado por esta patología. En cuanto a las técnicas quirúrgicas para su tratamiento, resulta necesario disponer de marcadores capaces de precisar de una forma más homogénea y precisa el éxito o el fracaso del mismo, de tal modo que pueda aconsejarse o descartarse su tratamiento quirúrgico en función de la efectividad esperada en cada caso.

Nuestros resultados sobre fragmentación del ADN espermático como marcador de calidad espermática en estos pacientes ponen en entredicho el hecho de que un varicocele subclínico no tenga un efecto nocivo en la calidad espermática del paciente simplemente por ser un varicocele pequeño y asintomático (Krause y col., 2002). De hecho, nuestros resultados sugieren que este tipo de varicocele, en pacientes que acuden a consulta exclusivamente por infertilidad manifiesta, presentan un grado de fragmentación del ADN espermático, también del tipo DDS, comparable al observado en pacientes con varicocele clínico. Nuestros resultados constituyen la primera evidencia de que, a efectos de infertilidad, un varicocele subclínico y un varicocele clínico presentan una fragmentación del ADN espermático similar e incrementada respecto al grupo control y por lo tanto son causa de infertilidad del paciente. De este modo, el estudio de la fragmentación del ADN en estos pacientes podría ser útil para determinar los casos en los que ambos eventos, varicocele e infertilidad, están asociados.

Los resultados obtenidos sobre la dinámica de fragmentación aportan diferencias en estos mismos grupos. En concreto, los pacientes con varicocele subclínico tienen una tasa

de fragmentación del ADN y similar a la del grupo control mientras que los pacientes con varicocele clínico tienen tasas de fragmentación estadísticamente superiores. Es decir, su ADN espermático se fragmenta a una mayor velocidad cuando las muestras son incubadas a 37°C. Esta diferencia podría estar relacionada con los niveles de especies reactivas de oxígeno (estrés oxidativo) las cuales se han asociado en estudios anteriores con estos pacientes (Pasqualotto y col., 2008).

Por último, respecto al hipotético beneficio que el tratamiento quirúrgico proporciona a los pacientes con varicocele, nuestros resultados sugieren que cuando el varicocele es clínico, el tratamiento quirúrgico aporta una mejora significativa sobre la integridad del ADN; mientras que en los pacientes con varicocele subclínico se obtienen peores resultados, ya que el tratamiento no mejora la integridad del ADN. Esto sugiere que estos pacientes no deberían ser operados.

5.4 Valoración de las dinámicas

En este trabajo se ha caracterizado por primera vez la dinámica de fragmentación del ADN en individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas y pacientes con varicocele (Objetivo 3, Artículos 1 y 3).

Nuestros resultados evidencian que existe una buena correlación entre la relación P1/P2 y la dinámica de fragmentación. Dicha correlación aporta valor al estudio dinámico de la fragmentación al demostrar que el grado de vulnerabilidad del ADN espermático, cuando las muestras son incubadas a 37°C, depende de la correcta expresión de la protamina 1 y la protamina 2. Es interesante indicar que la correlación obtenida en el estudio dinámico es ligeramente superior a la calculada en el estudio de la fragmentación

basal. Se trata de una aportación relevante porque muestra que el desequilibrio en la relación de protaminas P1/P2 es un factor que aporta vulnerabilidad al ADN espermático y lo hace más susceptible a sufrir daño por agentes externos tales como especies reactivas de oxígeno o enzimas nucleasas.

Nuestros resultados también evidencian que individuos con una fragmentación basal similar, independientemente de que sean pacientes o donantes fértiles, pueden presentar dinámicas de fragmentación diferentes. Tal y como muestran los resultados del Artículo 3, algunos donantes fértiles fragmentaron su ADN a mayor velocidad a pesar de que todo el grupo control partía de valores de fragmentación similares y considerados normales. El valor práctico de esta observación se podría trasladar a los bancos de semen en los que se utilizan otros criterios de selección de donantes (edad, cariotipo, seminograma, etc). En nuestra opinión, la incorporación del estudio dinámico de fragmentación del ADN espermático como criterio de selección de donantes podría comportar una mejora substancial en las tasas de embarazo.

Por otra parte, en el mismo Artículo 3 se demuestra cómo individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas presentan velocidades de fragmentación del ADN muy diferentes. En este grupo, que presenta una fragmentación basal heterogénea (recordemos que aproximadamente la mitad de los individuos analizados (54,5%) presenta valores de fragmentación basal similares a los obtenidos en los donantes fértiles), el estudio dinámico de la fragmentación del ADN aporta evidencias de anormalidad espermática. Por este motivo creemos que la aplicación de este ensayo podría ser de utilidad en la valoración de la calidad espermática de estos individuos, incluso en los portadores que poseen una fragmentación basal normal.

Los resultados del Artículo 1 muestran que pacientes con varicocele clínico y subclínico tienen comportamientos dinámicos diferentes, a pesar de presentar similares valores de fragmentación basal alterados. Mientras que en el grupo de varicocele clínico la dinámica de fragmentación del ADN es más rápida, los varicoceles subclínicos presentan una dinámica lenta que no difiere de los controles fértiles. Este hecho pone de manifiesto la existencia de una relación entre la condición clínica (grado de varicocele) y la dinámica de fragmentación.

En conjunto, nuestros resultados evidencian que la pérdida de integridad del ADN espermático, caracterizada desde una perspectiva dinámica y en grupos clínicos bien diferenciados, aporta información adicional sobre las causas y mecanismos que afectan a la calidad espermática.

Por último, en relación con las técnicas de reproducción asistida, mencionar que los procesos de preparación del espermatozoide podrían comprometer la integridad del ADN en caso que las muestras se sometan a incubación a temperaturas de 37°C durante determinados periodos de tiempos (Gosálvez y col.,2011). Si no se ha controlado el tiempo de incubación de manera adecuada la muestra podría presentar unos niveles de fragmentación incompatibles con la fecundación. La evaluación de la dinámica de fragmentación del ADN puede aportar una información importante respecto al uso y respecto a la ventana temporal en la cual las muestras deben manejarse o prepararse convenientemente para su uso en técnicas de reproducción asistida.

5.5 Protaminas

En este trabajo hemos determinado, por primera vez, la relación entre la protamina 1 y la protamina 2 (P1/P2) en los grupos de pacientes con varicocele clínico, subclínico y portadores de reorganizaciones cromosómicas. Asimismo, hemos determinado la existencia de una correlación de esta variable con la fragmentación del ADN (Objetivo 4, Artículo 1).

Los resultados obtenidos muestran una elevada correlación entre alteraciones en la relación P1/P2 y la presencia de fragmentación del ADN espermático en los pacientes con infertilidad analizados en comparación con individuos control fértiles. Hasta la fecha no se habían realizado estudios dinámicos de fragmentación del ADN desde la perspectiva del grado de integridad de protaminas ni se habían agrupado los pacientes en función de las causas de infertilidad aunque resultados similares fueron obtenidos por otros autores utilizando geles ácidos de poliacrilamida y urea (Aoki y col., 2005; Torregrasa y col., 2006). En este estudio, hemos tenido en cuenta la etiología del paciente, y los hemos clasificado como varicocele clínico, varicocele subclínico, portador de algún tipo de reorganización cromosómica equilibrada, y donantes fértiles o grupo control. Los resultados obtenidos indican que las alteraciones en la relación P1/P2 se asocian con fragmentación del ADN tanto en el aspecto puntual y estático de la fragmentación basal como también en el estudio dinámico de la fragmentación. La correlación obtenida entre la dinámica y la relación P1/P2 es mejor que la obtenida para la fragmentación basal lo que sugiere que los valores de la dinámica de fragmentación son más representativos del estado de protaminación del espermatozoide. Esto, a su vez, muestra la eficacia de la espermiogénesis, al menos a nivel de maduración nuclear.

Aunque la determinación de la relación P1/P2 se presenta frecuentemente como un marcador de infertilidad (Oliva, 2006) nuestros resultados demuestran que este marcador no es capaz de distinguir entre los diferentes grupos de pacientes estudiados, si bien coinciden con otros estudios en que los pacientes infértiles presentan valores alterados de la relación P1/P2 respecto al grupo de donantes fértiles. Sin embargo, al no ser capaz de determinar diferencias entre los distintos grupos de pacientes analizados, el estudio de la relación P1/P2 no nos aporta ninguna información adicional que pueda sugerir alguna causa o mecanismo probable de infertilidad asociado a la etiología concreta de cada uno de los grupos de pacientes analizados. Por otra parte, la aproximación dinámica de la fragmentación demuestra que la condición de varicocele clínico o subclínico tiene un efecto sobre la velocidad de fragmentación que no se manifiesta ni a través del estudio de la relación P1/P2 ni de la fragmentación basal.

En conclusión, los niveles de fragmentación basales del ADN espermático y la determinación de la dinámica de la fragmentación son marcadores que correlacionan con la relación P1/P2 y, en conjunto, aportan un valor añadido a nuestro conocimiento sobre las causas y mecanismos que subyacen a la infertilidad masculina.

5.6 Antioxidantes y fragmentación

En este trabajo hemos determinado el efecto que el tratamiento con antioxidantes orales ejerce sobre la integridad del ADN espermático y el seminograma en pacientes astenoteratozoospermicos. Este estudio es el primero en determinar el efecto del tratamiento con antioxidantes orales sobre la dinámica de fragmentación del ADN (Objetivo 5, Artículo 5).

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con antioxidantes prolonga la integridad del ADN espermático en el tiempo por lo que podría ser útil administrarlos en aquellos pacientes que tengan previsto someterse a algún tratamiento de reproducción asistida. Dado que estos procedimientos suelen comportar un cierto daño iatrogénico en caso de someter las muestras de semen a centrifugación o incubación a 37 °C (Gosálvez y col., 2011; Gosálvez y col.,2011). Por otra parte, el tratamiento con antioxidantes ha supuesto una reducción significativa de los niveles de fragmentación basal del ADN, así como una mejora en las variables del seminograma, especialmente en la vitalidad. Aunque no conocemos con exactitud de que manera el tratamiento con antioxidantes consigue reducir la fragmentación del ADN y mantener un efecto protector (Zini y Al-Hathal, 2011), este estudio dinámico de la fragmentación ha permitido observar un incremento de resistencia a la fragmentación del ADN en el tiempo después del tratamiento. Dado que hemos demostrado que existe una correlación entre la relación P1/P2 y la dinámica de fragmentación del ADN (Artículo 1, García-Peiró y col., 2011a), los resultados sugieren que los antioxidantes podrían favorecer el intercambio de histonas por protaminas durante la fase de espermiogénesis. De esta manera se disminuiría la susceptibilidad del ADN al daño de agentes externos, los cuales también podrían verse neutralizados en parte gracias a los mismos antioxidantes.

Si bien la efectividad del tratamiento con antioxidantes todavía suscita algunas dudas (Zini y Al-Hathal, 2011), la percepción general en este estudio es que dichos tratamientos mejoran la calidad espermática, al menos en pacientes astenoteratozoospermicos, y en consecuencia su tratamiento sería recomendable (Gharagozloo y Aitken, 2011). Sin embargo, como no todos los pacientes responden al tratamiento de la misma manera, es necesario investigar biomarcadores que pueden indicar

de forma objetiva qué pacientes podrían beneficiarse de estos tratamientos. Asimismo, y con el objetivo de mejorar e incrementar el número de nacimientos obtenidos gracias a estos tratamientos, estudios futuros deberían focalizarse en su optimización (tipo de antioxidante, dosis y duración para cada tipo o grupo de paciente según su fisiopatología) con la finalidad de aumentar su eficacia. Sobre esto último, señalar que la población de espermatozoides degradados DDS (muy incrementada en pacientes con varicocele y portadores de reorganizaciones (Objetivo 2, Artículo 4), se redujo de un modo significativo tras administrar antioxidantes. Esto sugiere que aquellos pacientes que presentan esta subpoblación espermática incrementada pueden ser candidatos de lograr un mayor beneficio con este tratamiento.

6. CONCLUSIONES

1. Los valores de fragmentación del ADN espermático en controles y pacientes analizados (varicocele, portadores de reorganizaciones cromosómicas y astenoteratozoospermicos) medidos mediante los métodos TUNEL, SCSA y SCD presentan una buena correlación.
2. En pacientes con varicocele, la correlación obtenida entre métodos citométricos y no citométricos fue menor, sugiriendo que la presencia de cuerpos apoptóticos presentes en el eyaculado de estos pacientes puede ser un factor de confusión.
3. El grupo de portadores de reorganizaciones cromosómicas presenta un valor de fragmentación del ADN espermático estadísticamente incrementado respecto al grupo control. Sin embargo existe una gran variabilidad interindividual, de manera que ser portador de una reorganización cromosómica no necesariamente implica valores anómalos de fragmentación.
4. El valor más alto de fragmentación del ADN espermático del total de casos estudiados fue en el portador de 9qh⁺⁺⁺, el cual también presentó importantes alteraciones sinápticas.
5. Los pacientes con varicocele clínico y subclínico que acuden por infertilidad tienen valores incrementados de fragmentación del ADN espermático.
6. Después del tratamiento quirúrgico los pacientes con varicocele clínico reducen los valores de fragmentación del ADN espermático mientras que los pacientes con varicocele subclínico no muestran reducción.
7. Las subpoblaciones espermáticas HDS y DDS están presentes, con distinta incidencia según el tipo de paciente, en todas las muestras analizadas. Los pacientes con varicocele y portadores de reorganizaciones cromosómicas presentan valores significativamente

incrementados de las subpoblaciones espermáticas HDS y DDS. La presencia de estas subpoblaciones, especialmente DDS, puede ser un marcador de la presencia de varicocele o de una posible reorganización cromosómica.

8. En relación a la dinámica de fragmentación, los pacientes con varicocele clínico muestran valores más elevados que los subclínicos, que a su vez no son diferentes de los que presentan los donantes fértiles.

9. La dinámica de fragmentación del ADN espermático en los individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas presenta valores superiores a las obtenidas en los donantes fértiles.

10. Todos los grupos de pacientes analizados (varicocele, portadores de reorganizaciones cromosómicas, ATZ) presentaron una relación de protaminas P1/P2 alterada respecto a los donantes fértiles, sin que existan diferencias entre los distintos grupos de pacientes.

11. Existe correlación entre la presencia de una relación de protaminas P1/P2 alterada y la fragmentación del ADN así como con la dinámica de fragmentación del ADN. La correlación obtenida entre la relación P1/P2 es mejor cuando se compara con la dinámica de fragmentación sugiriendo que el estudio dinámico de la fragmentación puede ser un marcador más sensible de la integridad genómica espermática.

12. El tratamiento con antioxidantes mejora los parámetros seminales y reduce la fragmentación del ADN (basal y dinámica) en pacientes con astenoteratozoospermia, aunque el tratamiento no afecta por igual a todos los pacientes y existe una gran variabilidad interindividual.

7. BIBLIOGRAFÍA

A

- Agarwal A, Deepinder F, Sharma RK, Ranga G, Li J. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil Steril* 2008b; 89: 124-8
- Agarwal A, Desai NR, Ruffoli R, Carpi A. Lifestyle and testicular dysfunction: A brief update. *Biomed Pharmacother* 2008a; 62: 550-3
- Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2006 May;12(5):630-3.
- Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rational, significance and treatment. *Urol Clin N Am* 2002; 29: 817-27
- Agarwal, A., Makker, K. & Sharma, R. (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American Journal of Reproductive Immunology* 59, 2-11.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 40: 183-9
- Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2009; 32: 46-56
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1037-46
- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122: 497-506

- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 1995; 108: 2017-25
- Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon – not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol* 2003; 518: 85-98
- Aitken, R.J. & De Iuliis, G.N. (2010) On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human reproduction* 16, 3-13.
- Aitken, R.J. and De Iuliis, G.N. (2007) Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 14, 727-733.
- Allamaneni SS, Naughton CK, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertil Steril* 2004; 82:1684-6.
- Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Evenson DP, Agarwal A. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2002; 78: 319-29
- Anderson K, Nisenblat V, Norman R. Lifestyle factors in people seeking infertility treatment - A review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2010; 50: 8-20
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-65

Aoki VW, Carrell DT. Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl*. 2003 Dec;5(4):315-24.

Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 2006; 27:890-8. Epub 2006 Jul 26.

Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, et al. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril* 2006; 86(5):1408-15.

Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005; 26(6):741-8.

Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res*. 1997; 236 -237.

B

Badouard C, Ménézou Y, Panteix G, Ravanat JL, Douki T, Cadet J et al. Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote* 2008; 16:9-13.

Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982; 93: 298-305

Barlow, A.L. and Hulten, M.A. (1998) Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 6, 350-358.

Barratt CL, Aitken RJ, Björndahl L, Carrell DT, de Boer P, Kvist U, Lewis SE, Perreault SD, Perry MJ, Ramos L, Robaire B, Ward S, Zini A. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications--a position report. *Hum Reprod.* 2010 Apr;25(4):824-38.

Barroso, G., Morshedi, M. & Oehninger, S. (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction* 15, 1338-1344.

Bellver J, Meseguer M, Muriel L, Garcia-Herrero S, Barreto MA, Garda AL, Remohi J, Pellicer A, Garrido N. Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *Hum Reprod* 2010; 25: 1713-21

Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H. and Guerin, J.F. (2003) Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 18, 1023-1028.

Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res.* 2005; 111(3-4):281-90.

Bian Q, Xu LC, Wang SL, Xia YK, Tan LF, Chen JF, Song L, Chang HC, Wang XR. Study on the relation between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occup Environ Med* 2004; 61: 999-1005

Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993; 49: 1083-8

Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Sakkas D. Sperm decondensation during fertilization in the mouse: presence of DNase I hypersensitive sites in situ and a putative role for topoisomerase II. *Zygote* 2000; 8: 197-202

Braun RE. Every sperm is sacred--or is it? *Nat Genet* 1998; 18: 202-4

Brewer L, Corzett M, Lau EY, Balhorn R. Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *J Biol Chem*. 2003 Oct 24;278(43):42403-8.

Brewer LR, Corzett M, Balhorn R. Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science*. 1999 Oct 1;286(5437):120-3.

Brinkworth MH. Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *Int J Androl* 2000; 23: 123-35

Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, et al. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2006; 21(3):685-93.

Brugnon, F., Janny, L., Communal, Y., Darcha, C., Szczepaniak, C., Pellestor, F., Vago, P., Pons-Rejraji, H., Artonne, C., Grizard, G. (2010) Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carrier patients. *Human Reproduction* [Epub ahead of print].

Brugnon, F., Van Assche, E., Verheyen, G., Sion, B., Boucher, D., Pouly, J.L., Janny, L., Devroey, P., Liebaers, I. & Van Steirteghem, A. (2006) Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Human Reproduction* 21, 685-693.

Buffone MG, Doncel GF, Marín Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Calamera JC.

Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. *Hum Reprod* 2004; 19:139-46.

Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A.

Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod*. 2007; 22:174-9. Epub 2006 Aug 18.

Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19:1401-8. Epub 2004 Apr 29.

Bungum M, Spanò M, Humaidan P, Eleuteri P, Rescia M, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART. *Hum Reprod*. 2008; 23(1):4-10.

Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J. and Giwercman, A. (2007) Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 22, 174-179.

C

Campbell, A.J. & Irvine, D.S. (2000) Male infertility and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *British Medical Bulletin* 56, 616-29.

- Carrell, D.T., Emery, B.R. & Hammoud, S. (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction Update* 13, 313-327.
- Carrell, D.T., Emery, B.R. & Hammoud, S. (2008) The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *International Journal of Andrology* 31, 537-545.
- Cayan S, Shavakhabov S, Kadioğlu A. Treatment of palpable varicocele in infertile men: a meta- analysis to define the best technique. *J Androl.* 2009 Jan-Feb;30(1):33-40. Epub 2008 Sep 4.
- Centola GM, Keller JW, Henzler M, Rubin P. Effect of low-dose testicular irradiation on sperm count and fertility in patients with testicular seminoma. *J Androl* 1994; 15: 608-13
- Chance B, Sies H, Boveris H. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605
- Chatterjee R, Haines GA, Perera DMD, Goldstone A, Morris ID. Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. *Hum Reprod* 2000; 15: 762-6
- Chehval MJ, Purcell MH. Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. *Fertil Steril.* 1992 Jan;57(1):174-7.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006 Jan-Feb;27(1):53-9.
- Codina-Pascual, M., Navarro, J., Oliver-Bonet, M., Kraus, J., Speicher, M.R., Arango, O., Egozcue, J. and Benet, J. (2006) Behaviour of human heterochromatic regions

- during the synapsis of homologous chromosomes. *Hum Reprod* 21, 1490-1497.
- Codina-Pascual, M., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Campillo, M., García, F., Egozcue, S., Abad, C., Egozcue, J. and Benet, J. (2005) Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 20, 2133-2139.
- Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008; 89(4):823-31.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003; 17: 1195-214
- Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C., Fernández, J.L. & Gosálvez, J. (2008) Alkali-labile sites in sperm cells from *Sus* and *Ovis* species. *International Journal of Andrology* 31, 354-363.
- Croteau DL, Bohr VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 25409-12
- Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA. Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res* 1999; 434: 137-48
- Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J* 2000; 14: 955-67
- de Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod.* 1991 Feb;6(2):245-50.
- de Iuliis GN, Newey RJ, King BV, Aitken RJ. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One* 2009; 4: e6446

D

- de Iuliis, G.N., Thomson, L.K., Mitchell, L.A., Finnie, J.M., Koppers, A.J., Hedges, A., Nixon, B. and Aitken, R.J. (2009) DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 81, 517-524.
- de Jonge C. Semen analysis: looking for an upgrade in class. *Fertil Steril*. 2012 Feb;97(2):260-6. Review.
- de Kretser, D.M. (1997) Male infertility. *Lancet* 349, 787-90. Review.
- de Lamirande E, Gagnon C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 487-95
- de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, et al. Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril* 2009; 91(3):715-22.
- de Rosa M, Boggia B, Amalfi B, Zarrilli S, Vita A, Colao A, Lombardi G. Correlation between seminal carnitine and functional spermatozoal characteristics in men with semen dysfunction of various origins. *Drugs R D*. 2005; 6:1-9.
- de Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, Maisto A, Cimmino F, Puca G, Colao A, Lombardi G. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod* 2003; 18: 1055-61
- Deepinder F, Makker K, Agarwal A. Cell phones and male infertility: dissecting the relationship. *Reprod Biomed Online* 2007; 15: 266-70

- di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol.* 2012;2012:854837. Epub 2011 Dec 13.
- Diemer T, Huwe P, Ludwig M, Hauck EW, Weidner W. Urogenital infection and sperm motility. *Andrologia* 2003; 35: 283-7
- Dominguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Balleca, J.L. and Oliva, R. (2007) Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A* 71, 1011-1018.
- Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002; 17: 3122-8

E

- Eggert-Kruse W, Kiefer I, Beck C, Demirakca T, Strowitzki T. Role for tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1-beta (IL-1beta) determination in seminal plasma during infertility investigation. *Fertil Steril* 2007; 87: 810-23
- Egozcue, S., Blanco, J., Vendrell, J.M., García, F., Veiga, A., Aran, B., Barri, P.N., Vidal, F. & Egozcue, J. (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reproduction Update* 6, 93-105.
- Eguchi J, Koji T, Nomata K, Yoshii A, Shin M, Kanetake H. Fas-Fas ligand system as a possible mediator of spermatogenic cell apoptosis in human maturation-arrested testes. *Hum Cell* 2002; 15: 61-8

- Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejo JM, Ardoy M, Pacheco A, Gosálvez J. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl.* 2006;27:106-11.
- Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL, Gosálvez J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2009; 18:609-16.
- Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl.* 2001 Jan-Feb;22(1):45-53.
- Erenpreiss, J., Jepson, K., Giwercman, A., Tsarev, I., Erenpreisa, J. & Spano, M. (2004) Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Human Reproduction* 19, 2277-2282.
- Evenson D and Jost L. Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. *Curr Protoc Cytom* 2001; Chapter 7:Unit 7.13.
- Evenson DP and Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 2006; 65:979-91.
- Evenson DP, Jost LK, Corzett M and Balhorn R. Characteristics of human chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 2000; 21,739–746.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14:1039-49.

Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23:25-43.

Evenson, D.P. & Wixon, R. (2008) Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertility & Sterility* 90, 1229-1231.

Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P. & 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, 1039-1049.

F

Fabricant JD, Legator MS, Adams PM. Post-meiotic cell mediation of behavior in progeny of male rats treated with cyclophosphamide. *Mutat Res* 1983; 119: 185-190

Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, Foresta C. Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Nov;65(5):606-10.

Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2005; 84(4):860.

- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005; 84(4):833-42.
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005; 84:833-42.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003; 24: 59 -66.
- Folgerø T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergsen T, Oian P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod*. 1993 Nov;8(11):1863-8.
- Fortunato A, Leo R, Liguori F. Effects of cryostorage on human sperm chromatin integrity. *Zygote*. 2012 Mar 8:1-7.
- Foster, H.A., Abeydeera, L.R., Griffin, D.K.& Bridger, J.M. (2005) Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *Journal of Cell Science* 118, 1811-1820.
- Fraczek M, Szumala-Kakol A, Jedrzejczak P, Kamieniczna M, Kurpisz M. Bacteria trigger oxygen radical release and sperm lipid peroxidation in in vitro model of semen inflammation. *Fertil Steril* 2007; 88 (4 Suppl): 1076-85
- Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11003-6

Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 1996; 351: 199-203

Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000; 45: 215-25

Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, Kojima K, Kamidono S. Decrease of topoisomerase I activity in the testes of infertile men with varicocele. *Arch Androl* 1988; 21:45-50.

G

Gangel EK; American Urological Association, Inc and American Society for Reproductive Medicine. AUA and ASRM produce recommendations for male infertility. American Urological Association, Inc and American Society for Reproductive Medicine. *Am Fam Physician*. 2002 Jun 15;65(12):2589-90.

García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J et al. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril* 2011; 95:105-9. Epub 2010 Jul 29..

García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Amengual MJ, López-Fernández C, Gosálvez J, Benet J. Differential clustering of sperm subpopulations in infertile males with clinical varicocele and carriers of rearranged genomes. *J Androl*. 2011; Aug 11. [Epub ahead of print]

García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, Gosálvez J, Benet J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally

rearranged chromosomes. *Int J Androl*. 2011 Dec;34(6 Pt 2):e546-53. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01153.x. Epub 2011 Apr 28.

García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, Benet J. Sperm DNA integrity and meiotic behavior assessment in an infertile male carrier of a 9qh+++ polymorphism. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:730847. Epub 2010 Dec 9.

Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 2004; 6: 59-65

Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod*. 2011 Jul;26(7):1628-40. Epub 2011 May 5.

Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 2009; 15.

Gogvadze V, Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem Biol Interact* 2006; 163: 4-14

Goldstein M, Eid JF. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. *J Urol* 1989; 142: 743-5

Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*. 1993 Jul;207(1):202

Gosalvez et al. Sperm DNA fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertility and Sterility* 92:170-173;(2009)

Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Nuñez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril* 2009; 92(1):170-3.

Gosálvez J, de la Torre J, López-Fernández C, Pérez-Gutiérrez L, Ortega L, Caballero P, et al. DNA fragmentation dynamics in fresh versus frozen thawed plus gradient-isolated human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med*. 2010 ; 56(1):27- 36.

Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Gouraud A, Holt WV. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev*. 2011 Dec;78(12):951-61.

Gosálvez J, Nuñez R, Fernández JL, López-Fernández C, Caballero P. Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. *Andrologia*. 2011 Dec;43(6):373-7.

Grasso M, Lania C, Castelli M, Galli L, Franzoso F, Rigatti P. Low-grade left varicocele in patients over 30 years old: the effect of spermatic vein ligation on fertility. *BJU Int*. 2000 Feb;85(3):305-7.

Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl*. 2005; 26:349-53.

H

Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet* 2000; 355: 1179-80

Hauser R, Meeker JD, Singh NP, Silva MJ, Ryan L, Duty S, Calafat AM. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod* 2007; 22: 688-95

Hawk HW. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. *J Dairy Sci.* 1987; 70(7):1487-503.

Heerdt BG, Houston MA, Anthony GM, Augenlicht LH. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(mt)$) in the coordination of p53-independent proliferation and apoptosis pathways in human colonic carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; 58: 2869-75

Henkel R, Fransman WO, Hipler UC, Wiegand C, Schreiber G, Menkveld R, Weitz F, Fisher D. *Typha capensis* (Rohrb.)N.E.Br. (bulrush) extract scavenges free radicals, inhibits collagenase activity and affects human sperm motility and mitochondrial membrane potential in vitro – A pilot study. *Andrologia* 2011; (in press)

Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill W-B, Kruger TF. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81: 965-72

Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill W-B, Kruger TF. DNA fragmentation of spermatozoa and ART. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 477-84

- Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 2005; 83: 635-42
- Henkel R, Maaß G, Jung A, Haidl G, Schill WB, Schuppe HC. Age-related changes in seminal polymorphonuclear elastase in men with asymptomatic inflammation of the genital tract. *Asian J Androl* 2007; 9: 299-304
- Henkel, R., Hoogendijk, C.F., Bouic, P.J. & Kruger T.F. (2010) TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. *Andrologia* 42, 305-313.
- Hirsh AV, Cameron KM, Tyler JP, Simpson J, Pryor JP. The Doppler assessment of varicoceles and internal spermatic vein reflux in infertile men. *Br J Urol*. 1980 Feb; 52(1):50-6.
- Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 363-9
- Hoyes KP, Lord BI, McCann C, Hendry JH, Morris ID. Transgenerational effects of procreation paternal contamination with ⁵⁵Fe. *Rad Res* 2001; 156: 488-94
- Huang C, Li J, Zheng R, Cui K. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human hepatoma cells is mediated by CD95(APO-1/Fas) receptor/ligand system and may involve activation of wild-type p53. *Mol Biol Rep* 2000; 27: 1-11
- Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 1978; 190: 905-26

Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy.

Biochem Biophys Res Commun. 1993 Jun 30;193(3):1347-54.

Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. Br Med J (Clin Res Ed). 1985 Dec 14;291(6510):1693-7.

Hurtado de Catalfo GE, Ranieri-Casilla A, Marra FA, de Alaniz MJ, Marra CA. Oxidative stress biomarkers and hormonal profile in human patients undergoing varicocelectomy. Int J Androl. 2007 Dec;30(6):519-30.

In't Veld P, Brandenburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. Lancet 1995; 346: 773

I

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. J Androl. 2000;21: 33 - 44.

Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril 1992; 57: 409-16

J

Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of non-smoking mothers. J Nat Canc Inst 1997; 89: 238-44

Jung A and Schuppe HC. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia* 2007; 39:203-15.Review.

K

Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl* 2002; 4: 97-103

Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997; 68: 519-24

Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006; 27: 450-2

Krause W, Müller HH, Schäfer H, Weidner W. Does treatment of varicocele improve male fertility? results of the 'Deutsche Varikozelenstudie', a multicentre study of 14 collaborating centres. *Andrologia*. 2002 Jun;34(3):164-71.

Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986; 46:1118-23.

Kurinczuk JJ, Bower C. Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. *BMJ* 1997; 315: 1260-5

Lachaud C, Tesarik J, Canadas ML, Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2004; 19: 607-10

L

Lammers, J.H., Offenberg, H.H., van Aalderen, M., Vink, A.C., Dietrich, A.J. and

Heyting, C. (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14, 1137-1146.

Lavitrano M, French D, Zani M, Frati L, Spadafora C. The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 161-9

Lee J, Binsaleh S, Lo K, Jarvi K. Varicoceles: the diagnostic dilemma. *J Androl*. 2008 Mar-Apr;29(2):143-6. Epub 2007 Dec 12.

Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997; 138: 2081-8

Lestienne P, Reynier P, Chrétien MF, Penisson-Besnier I, Malthiery Y, Rohmer V. Oligoasthenospermia associated with multiple mitochondrial DNA rearrangements. *Mol Hum Reprod*. 1997 Sep;3(9):811-4.

Lewis SEM, O'Connell M, Stevenson M, Thompson-Cree L, McClure N. An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Hum Reprod* 2004; 19: 1385-94

Lima SB, Cenedeze MA, Bertolla RP, Filho PA, Oehninger S, Cedenho AP. Expression of the HSPA2 gene in ejaculated spermatozoa from adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril* 2006; 86(6):1659-63.

Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ et al. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but

- might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008; 90:352-9.
Epub 2007 Sep 27. Review.
- Lissitsina, J., Mikelsaar, R. and Punab, M. (2006) Cytogenetic analyses in infertile men. *Arch Androl* 52, 91-95.
- Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, Olsen J, Scheike T, Enghusen Poulsen H, Bonde JP. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod* 2003; 18: 1265-72
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 528-32
- López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology*. 2007; 68(9):1240-50.
- López-Fernández C, Gage MJ, Arroyo F, Gosálbez A, Larrán AM, Fernández JL, Gosálvez J. (2009) Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (*Tinca tinca*: Teleostei, Cyprinidae) measured using a sperm chromatin dispersion test. *Reproduction* 138, 257-266.
- López-Fernández C, Gage MJ, Arroyo F, Gosálbez A, Larrán AM, Fernández JL et al. Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (*Tinca tinca*: Teleostei, Cyprinidae) measured using a sperm chromatin dispersion test. *Reproduction* 2009; 138:257-66. Epub 2009 Jun 3.
- López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gosálbez, A., Arroyo, F., Vázquez, J.M., Holt, W.V. & Gosálvez, J. (2008) Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. *Ram. Theriogenology* 70, 898-908.

Luczaj W, Skrzydlewska E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett* 2003; 8: 391-413

M

Madon, P.F., Athalye, A.S. and Parikh, F.R. (2005) Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online* 11, 726-732.

Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 1087-97

Makker, K., Agarwal, A. & Sharma, R. (2009) Oxidative stress & male infertility. *Indian Medical Research* 129, 357-367.

Mancini A, Meucci E, Milardi D, Giacchi E, Bianchi A, Pantano AL et al. Seminal antioxidant capacity in pre- and postoperative varicocele. *J Androl* 2004; 25:44- 9.

Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.* 1995; 52(4):864-7.

Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 2002; 17: 1257-65

Marchiani S, Tamburrino L, Forti G, Baldi E, Muratori M. M540 bodies and their impact on flow cytometric analyses of human spermatozoa. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;65:509-14. Review.

- Marchiani, S., Tamburrino, L., Maoggi, A., Vannelli, G.B., Forti, G., Baldi, E. & Muratori, M. (2007) Characterization of M540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies. *Molecular Human Reproduction* 13, 621-631.
- Marcon, L. & Boissonneault, G. (2004) Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biology of Reproduction* 70, 910-918.
- Martin RH. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* 2008; 14(4):379-90.
- Martin, R.H. (2008) Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 16, 523-531.
- Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3-4):317-36.
- McLachlan, R.I., Mallidis, C., Ma, K., Bhasin, S. & de Kretser, D.M. (1998) Genetic disorders and spermatogenesis. *Reproduction Fertility Device* 10, 97-104.
- McPherson SM, Longo FJ. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 268-79
- McPherson SM, Longo FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol.* 1993 Jul;158(1):122-30.
- McVicar CM, McClure N, Williamson K, Dalzell LH, Lewis SE. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril* 2004; 81 (Suppl 1): 767-74

- Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. *Hum Reprod* 2008; 23: 1932-40
- Ménézo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clément P, Benkhalifa M. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14:418-21.
- Meuwissen, R.L., Offenberg, H.H., Dietrich, A.J., Riesewijk, A., van Iersel, M. and Heyting, C. (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *Embo J* 11, 5091-5100.
- Migliore L, Naccarati A, Zanello A, Scarpato R, Bramanti L, Mariani M. Assessment of sperm DNA integrity in workers exposed to styrene. *Hum Reprod* 2002; 17: 2912-8
- Mitchell, L.A., De Iuliis, G.N. & Aitken, R.J. (2010) The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *International Journal of Andrology* [Epub ahead of print].
- Monga M, Roberts JA. Spermagglutination by bacteria: Receptor-specific interactions. *J Androl* 1994; 15: 151-6
- Moretti, E., Pascarelli, N.A., Giannerini, V., Geminiani, M., Anichini, C. & Collodel, G. (2009) X, Y aneuploidies and transmission electron microscopy studies in spermatozoa from five carriers of different reciprocal translocations. *Asian Journal of Andrology* 11, 325-332.

Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17: 990-8

Mostafa T, Anis TH, Ghazi S, El-Nashar AR, Imam H, Osman IA. Reactive oxygen species and antioxidants relationship in the internal spermatic vein blood of infertile men with varicocele. *Asian J Androl* 2006; 8:451-4.

Mudrak O, Tomilin N, Zalensky A. Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *J Cell Sci.* 2005 Oct 1;118(Pt 19):4541-50.

Muratori, M., Forti, G. & Baldi, E. (2008) Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling. *Cytometry Part A* 73, 785-787.

Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Alvarez, J.G, & Fernández, J.L. (2007) Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *Journal of Andrology* 28, 38-49.

N

Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001; 7:473-81.

Navarro, J., Templado, C., Benet, J., Lange, R., Rajmil, O. and Egozcue, J. (1990) Sperm chromosome studies in an infertile man with partial, complete asynapsis of meiotic bivalents. *Hum Reprod* 5, 227-229.

Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.* 1991 May;87(1):81-3.

Nili HA, Mozdarani H, Aleyasin A. Correlation of sperm DNA damage with protamine deficiency in Iranian subfertile men. *Reprod Biomed Online* 2009; 18(4):479-85.

O

Odorisio T, Rodriguez TA, Evans EP, Clarke AR, Burgoyne PS. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat Genet.* 1998 Mar;18(3):257-61.

Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; 12(4):417-35.

Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, Starke H, Greene C, Ko E, Martin RH. Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod.* 2005 Mar;20(3):683-8. Epub 2005 Feb 2.

Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 1988; 122: 787-94

P

Paasch U, Grunewald S, Kratzsch J, Glander HJ. Obesity and age affect male fertility potential. *Fertil Steril* 2010; 2010 Jul 27.

- Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril* 1997; 67: 1115-20
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Pasqualotto EB, Agarwal A. Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Urol Int* 2008; 81(3):263-70.
- Pasqualotto FF, Sundaram A, Sharma RK, Borges E Jr, Pasqualotto EB, Agarwal A. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. *Fertil Steril* 2008; 89:602-7. Epub 2007 May 7.
- Perez-Crespo M, Moreira P, Pintado B, Gutierrez-Adan A. Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice. *J Androl* 2008; 29: 47-54
- Perrin, A., Caer, E., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Benet, J., Amice, V., De Braekeleer, M. and Morel, F. (2009) DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril* 92, 583-589.
- Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol* 1999; 48: 427-34
- Peters, A.H., Plug, A.W., van Vught, M.J. and de Boer, P. (1997) A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome res* 5, 66-68.
- Piomboni P, Gambera L, Serafini F, Campanella G, Morgante G, De Leo V. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian J Androl*. 2008; 10:201-6. Epub 2007 Dec 20.
- Pittoggi C, Zaccagnini G, Giordano R, Magnano AR, Baccetti B, Lorenzini R, Spadafora C. Nucleosomal domains of mouse spermatozoa chromatin as potential sites for

retroposition and foreign DNA integration. *Mol Reprod Dev.* 2000 Jun;56(2 Suppl):248-51.

Plastira K, Msaouel P, Angelopoulou R, Zanioti K, Plastiras A, Pothos A, et al. The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24(10):437-43.

Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development. *Int Rev Cytol* 1986; 105: 1-65

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on varicocele and infertility. *Fertil Steril.* 2006 Nov;86 (5 Suppl 1):S93-5. Review

Puscheck EE, Jeyendran RS. The impact of male factor on recurrent pregnancy loss. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007; 19:222-8.

Q

Qiu J, Hales BF, Robaire B. Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamide exposure. *Biol Reprod* 1995; 53: 1465-73

R

Reichenberg A, Gross R, Weiser M, Bresnahan M, Silverman J, Harlap S, Rabinowitz J, Shulman C, Malaspina D, Lubin G, Knobler HY, Davidson M, Susser E. Advancing paternal age and autism. *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63: 1026-32

Rossato M, La Sala GB, Balasini M, Taricco F, Galeazzi C, Ferlin A, Foresta C. Sperm treatment with extracellular ATP increases fertilization rates in in-vitro fertilization for male factor infertility. *Hum Reprod* 1999; 14: 694-7

Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge University Press, Cambridge, 2000

Russell LD, Peterson RN. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 635-41

S

Sadek A, Almohamdy AS, Zaki A, Aref M, Ibrahim SM, Mostafa T. Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. *Fertil Steril* 2011; 95:1705-8. Epub 2011 Feb 3.

Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl.* 1997; 18:294-301.

Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl.* 1995;16: 80 -87.

Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4: 31-7

- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1061-7
- Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W, Bizzaro D. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Hum Fertil (Camb)*. 2004; 7:99-103. Review.
- Sakkas, D., Seli, E., Bizzaro, D., Tarozzi, N. and Manicardi, G.C. (2003) Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 7, 428-432.
- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas Jr,AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 2002; 78: 1215-24
- Sanchez-Pena LC, Reyes BE, Lopez-Carrillo L, Recio R, Moran-Martinez J, Cebrian ME, Quintanilla-Vega B. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 196: 108-13
- Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertil Steril*. 2010; 93:314-8. Epub 2009 Sep 11.
- Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 1992; 267: 5317-23

- Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol*. 1998; 82:76-80.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 82: 378-83
- Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006; 223: 54-60
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005; 20(12):3446-51.
- Shalet SM, Tsatsoulis A, Whitehead E, Read G. Vulnerability of the human Leydig cell to radiation damage is dependent upon age. *J Endocrinol* 1989; 120: 161-5
- Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48: 835-50
- Shefi S, Tarapore PE, Walsh TJ, Croughan M, Turek PJ. Wet heat exposure: a potentially reversible cause of low semen quality in infertile men. *Int Braz J Urol* 2007; 33: 50-7
- Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 529-36
- Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 1999; 20: 718-23
- Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Hum Reprod* 2005; 20: 452-5

- Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;90(3-4):219-26. Review.
- Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; Jan 19;(1):CD007411.
- Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H (ed.) *Oxidative stress.* pp 1-8; 1985; Academic Press, London, UK
- Silver EW, Eskenazi B, Evenson DP, Block G, Young S, Wyrobek AJ. Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *J Androl.* 2005; 26:550-6.
- Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril* 2011; 95: 652-7
- Sipos A, Rasmussen F, Harrison G, Tynelius P, Lewis G, Leon DA, Gunnell D. Paternal age and schizophrenia: a population based cohort study. *BMJ* 2004; 329: 1070
- Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF, Veldhoven JL, Weber RF, Dohle GR. Decreased sperm DNA fragmentation after surgical varicocelelectomy is associated with increased pregnancy rate. *J Urol* 2010; 183(1):270-4.
- Solari, A.J., Ponzio, R. and Rey Valzacchi, G. (1991) Synaptonemal complex karyotyping in an oligospermic patient with heterochromatin duplication in chromosome n. 9. *Medicina (B Aires)* 51, 217-221.
- Song GS, Seo JT. Changes in the scrotal temperature of subjects in a sedentary posture over a heated floor. *Int J Androl* 2006; 29: 446-57

- Sotolongo B, Lino E, Ward WS. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod* 2003; 69, 2029–2035.
- Sotolongo B, Ward WS. DNA loop domain organization: the three-dimensional genomic code. *J Cell Biochem Suppl.* 2000;Suppl 35:23-6.
- Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update.* 2006; 12(1):23-37.
- Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl.* 1996; 17:530-7.
- Sun F, Ko E, Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 25;4:1.
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602-7
- Sun, F., Mikhaail-Philips, M., Oliver-Bonet, M., Ko, E., Rademaker, A., Turek, P. and Martin, R.H. (2008) Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 14, 399-404.
- Sun, F., Turek, P., Greene, C., Ko, E., Rademaker, A. and Martin, R.H. (2007) Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 87, 565-571.

T

Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasemzadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia* 2008; 40:245-51.

Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl* 2001; 22:382-94.

Torregrosa N, Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Balleca JL, Oliva R. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 2006; 21: 2084-9

Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008; 14:243-58. Epub 2008 Feb 14.

Trottmann M, Becker AJ, Stadler T, Straub J, Soljanik I, Schlenker B, Stief CG. Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *Eur Urol* 2007; 52: 355-67

Tunc O, Thompson J, Tremellen K. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reprod Biomed Online*. 2009 Jun;18(6):761-8.

Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl* 2008; 29(5):488-98.

Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 1864-71

V

Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG Jr. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online* 2007; 15: 514-9

Vestergaard M, Mork A, Madsen KM, Olsen J. Paternal age and epilepsy in the offspring. *Eur J Epidemiol* 2005; 20: 1003-5

Vicari E, Calogero AE. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatic vesiculitis. *Hum Reprod*. 2001; 16:2338-42.

Vidal, F., Moragas, M., Català, V., Torelló, M.J., Santaló, J., Calderón, G., Gimenez, C., Barri, P.N., Egozcue, J. and Veiga, A. (1993) Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 8, 1740-1743.

Vine MF. Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl* 1996; 19: 323-37

W

Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril* 2003; 80 Suppl 2: 844-50

Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*. 1991 Apr;44(4):569-74. Review.

- Ward WS, Partin AW, Coffey DS. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma*. 1989 Sep;98(3):153-9.
- Ward WS. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*. 1993 Jun;48(6):1193-201. Review.
- Wilkins JR, Hundley VD. Paternal occupational exposure to electromagnetic fields and neuroblastoma in offspring. *Am J Epidemiol* 1990; 131: 995-1008
- Will MA, Swain J, Fode M, Sonksen J, Christman GM, Ohl D. The great debate: varicocele treatment and impact on fertility. *Fertil Steril* 2011; 95:841-52. Epub 2011 Jan 26.
- World Health Organization (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 128.
- Wright EJ, Young GP, Goldstein M. Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men. *Urology* 1997; 50:257-9.
- Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):29471-7. Epub 2003 May 29.

X

- Xu DX, Shen HM, Zhu QX, Chua L, Wang QN, Chia SE, Ong CN. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res* 2003; 534: 155-63

Y

Yakin, K., Balaban, B. and Urman, B. (2005) Is there a possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis? *Int J Urol* 12, 984-989.

Zalenskaya IA, Zalensky AO. Telomeres in mammalian male germline cells. *Int Rev Cytol.* 2002;218:37-67. Review.

Z

Zini A, Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian J Androl.* 2011 May;13(3):374-81. Epub 2011 Apr 25. Review.

Zini A, Azhar R, Baazeem A, Gabriel MS. Effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm chromatin and DNA integrity: a prospective trial. *Int J Androl.* 2011 Feb;34(1):14-9.

Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 2001 Apr;75(4):674-7).

Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2008; 23:2663-8. Epub 2008 Aug 29. Review.

Zini A, Buckspan M, Berardinucci D, Jarvi K. The influence of clinical and subclinical varicocele on testicular volume. *Fertil Steril.* 1997 Oct;68(4):671-4.

- Zini A, Phillips S, Courchesne A, Boman JM, Baazeem A, Bissonnette F et al. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2009; 91:2495-500. Epub 2008 Jun 13.
- Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26:427-32. Epub 2009 Sep 19. Review
- Zini, A. & Sigman, M. (2009) Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of Andrology* 30, 219-229.
- Zorn B, Auger J, Velikonja V, Kolbezen M, Meden-Vrtovec H. Psychological factors in male partners of infertile couples: relationship with semen quality and early miscarriage. *Int J Androl* 2008; 31: 557-64